

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## *Efecto de carbovir-trifosfato sobre la función plaquetaria*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**María Amparo Blanch Ruiz**

*Tutores:* Dra. Ángeles Álvarez Ribelles,  
Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

*Tutor académico:* María Pilar López Gresa

Curso Académico: 2015/2016

Valencia, Julio de 2016



**Alumno:** María Amparo Blanch Ruiz

**Tutores:** Dra. Ángeles Álvarez Ribelles y Dr. Juan V. Esplugues Mota

**Fecha:** Valencia, Julio 2016

**Título:** Efecto de carbovir-trifosfato sobre la función plaquetaria

**Resumen:**

Abacavir es un fármaco antirretroviral ampliamente utilizado en el tratamiento del SIDA. Se metaboliza en el citoplasma de las células para dar lugar a carbovir-trifosfato, su metabolito activo. Se ha observado que el uso de abacavir está asociado con la aparición de efectos adversos a nivel cardiovascular, en particular con un mayor riesgo de sufrir infarto de miocardio. Sin embargo, se desconoce si estos efectos están producidos por abacavir o por carbovir-trifosfato, o cuales son los mecanismos responsables.

La plaqueta tiene un papel fundamental en la patofisiología del infarto de miocardio, siendo fundamental en el desarrollo del trombo que conduce a la isquemia y al infarto. En este sentido, recientemente se ha demostrado que abacavir induce tanto interacción plaqueta-endotelio como interacción plaqueta-leucocito sin producir la activación plaquetaria.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de carbovir-trifosfato en la función plaquetaria, en particular sobre:

- la interacción plaqueta-endotelio: empleando un sistema de cámara paralela de flujo que reproduce la velocidad a la que viaja la sangre por el torrente sanguíneo,
- la interacción plaqueta leucocito: utilizando la citometría de flujo que permite separar las diferentes poblaciones leucocitarias y mediante un anticuerpo específico para plaquetas (CD41), determinar la presencia de plaquetas en cada población de leucocitos,
- la activación plaquetaria: determinando la expresión de P-selectina en la población de plaquetas, mediante la citometría de flujo.

Esto nos permitirá dilucidar si los efectos de abacavir sobre la función plaquetaria podrían ser o no provocados por carbovir-trifosfato y ayudaría a explicar el mecanismo por el cual abacavir puede producir toxicidad vascular.

Del mismo modo que abacavir, carbovir-trifosfato induce interacción plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito y no induce un incremento en la expresión de P-selectina, por tanto, no activa las plaquetas. La única diferencia entre los efectos de estos dos compuestos es el tipo celular implicado en la interacción plaqueta-endotelio: en el caso de la interacción inducida por abacavir el compuesto esta ejerciendo un efecto sobre las células endoteliales mientras que en la inducida por carbovir-trifosfato, éste ejerce una acción tanto sobre células endoteliales como sobre plaquetas.

**Palabras clave:** Abacavir, carbovir-trifosfato, plaqueta, leucocito, endotelio, interacción plaqueta-leucocito, interacción plaqueta-endotelio.

**Student:** María Amparo Blanch Ruiz

**Professors:** Dra. Ángeles Álvarez Ribelles y Dr. Juan V. Esplugues Mota

**Date:** July 2016, Valencia

**Title:** Effect of carbovir-triphosphate on platelet function

**Abstract:**

Abacavir is an antiretroviral drug widely used in the treatment of AIDS. It is metabolized in the cytoplasm of the cells to lead to carbovir-triphosphate, its active metabolite. Several studies have shown the association of abacavir with cardiovascular adverse effects, particularly with an increased risk of myocardial infarction. However, it is unknown whether these effects are caused by abacavir or by carbovir-triphosphate, neither the mechanisms involved.

Platelet plays a major role in the pathophysiology of myocardial infarction, being important in the thrombus development leading to ischemia and infarction. In this regard, it has recently demonstrated that abacavir induces both platelet-endothelium and platelet-leukocyte interactions, but doesn't induce platelet activation.

Therefore the aim of this study was to analyze the effects of carbovir-triphosphate on platelet function by characterizing its effect on:

- platelet-endothelium interaction: employing a flow chamber that reproduces the flow shear rate present on the vessel wall,
- platelet-leukocyte interaction: using flow cytometry that will differentiate leukocyte subpopulations and will analyze by an specific antibody for platelets (CD41), the presence of platelets in each subpopulation,
- platelet activation: measuring the expression of P-selectin in the population of platelets, by flow cytometry.

This will allow us to determine whether the effects of abacavir on platelet function could be induced or not by carbovir-triphosphate and will help to explain the mechanism by which abacavir would cause vascular toxicity.

In the same way of abacavir, carbovir triphosphate induces platelet-endothelium and platelet-leukocyte interactions, and doesn't induce an increase on P-selectin expression, so it doesn't activate platelets. The only one difference between the effects of these two compounds is the cell type involved on platelet-endothelium interaction: in the case of the interaction induced by abacavir this compound is exerting an effect on endothelial cells whereas on the interaction induced by carbovir-triphosphate, this exerts an effect on both endothelial cells and platelets.

**Keywords:** Abacavir, carbovir-triphosphate, platelet, leukocyte, endothelium, platelet-leukocyte interaction, platelet-endothelium interaction.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ángeles Álvarez Ribelles y Juan Vicente Esplugues Mota por haberme permitido realizar este trabajo bajo su dirección y por su confianza en mí. Especialmente agradecer a Ángeles por su ayuda, su tiempo y por su interés en mi formación científica.

Dar las gracias también a toda la gente del laboratorio por haberme acogido desde el primer día, por el ambiente que hay en el laboratorio y por la compañía que han hecho que estos últimos meses hayan sido toda una experiencia. Sobre todo, a Samu por haberme enseñado cómo funciona el trabajo en el laboratorio, por su ayuda, sus consejos y su apoyo, a Nicole por haberme guiado en el laboratorio cuando llegué, y a Víctor, por estar siempre pendiente y dispuesto a ayudarme.

Aunque estos últimos meses no nos hayamos visto demasiado, así somos nosotras, también quería dar las gracias a mis amigas “biotecs” porque después de haber estado juntas estos cuatro años puedo decir que sin vosotras este viaje no hubiera sido lo mismo, y aunque ahora nuestros caminos se separan siempre recordaremos que esto lo empezamos juntas.

A mi familia, agradecer que cada uno a su modo también me hayan ayudado en todo lo que ha estado en sus manos, por su apoyo, y su ánimo, y por escucharme aunque la mayoría de veces no supieran de que estaba hablando.

***Muchas gracias a todos...***

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.	INFECCIÓN Y CICLO BIOLÓGICO DEL VIH.....	1
2.	FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES .....	3
2.1	<i>Abacavir (ABC).....</i>	6
2.2	<i>Carbovir-trifosfato (CBV-TP).....</i>	7
3.	EFECTOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	8
4.	PROCESO INFLAMATORIO: FUNCIÓN PLAQUETARIA.....	9
4.1	<i>Interacción plaqueta-endotelio .....</i>	10
4.2	<i>Interacción plaqueta-plaqueta: agregación .....</i>	11
4.3	<i>Interacción plaqueta-leucocito.....</i>	12
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
1.	MÉTODOS.....	15
1.1	<i>Aislamiento y cultivo de células endoteliales.....</i>	15
1.2	<i>Extracción de plasma rico en plaquetas (PRP) y preparación de plaquetas lavadas humanas.....</i>	16
1.3	<i>Protocolo experimental de tratamiento.....</i>	16
1.4	<i>Ensayo de adhesión en cámara paralela de flujo.....</i>	17
1.5	<i>Análisis de la interacción plaqueta-leucocito.....</i>	19
1.6	<i>Determinación de la activación plaquetaria mediante el análisis de la expresión de la molécula de adhesión P-selectina .....</i>	20
2.	MATERIALES .....	21
3.	COMITÉ ÉTICO .....	21
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
1.	ESTUDIO DEL EFECTO DE CBV-TP SOBRE LA INTERACCIÓN PLAQUETA-ENDOTELIO .....	22
1.1	<i>Interacción plaqueta-endotelio .....</i>	22
1.2	<i>Determinación del tipo celular implicado en la interacción plaqueta-endotelio inducida por CBV-TP.....</i>	23
2.	ANÁLISIS DEL EFECTO DE CBV-TP SOBRE LA INTERACCIÓN PLAQUETA-LEUCOCITO .....	24
2.1	<i>Interacción plaqueta-neutrófilo .....</i>	24
2.2	<i>Interacción plaqueta-monocito .....</i>	25
2.3	<i>Interacción plaqueta-linfocito.....</i>	25
3.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE CBV-TP SOBRE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA .....	26
3.1	<i>Análisis de la expresión de P-selectina en PRP .....</i>	26
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>31</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Combinaciones de tratamiento para determinar el tipo celular implicado en la interacción .....	18
<b>Tabla 2.</b> Reactivos, anticuerpos y fármacos antirretrovirales .....	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico del VIH .....	2
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico del VIH que muestra los diferentes sitios de acción sobre los que pueden actuar los diferentes fármacos antirretrovirales.....	3
<b>Figura 3.</b> Fármacos ITIAN .....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura química de abacavir, guanosina y carbovir-trifosfato.....	6
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del metabolismo de abacavir y el mecanismo de acción de carbovir-trifosfato sobre la replicación del VIH.....	7
<b>Figura 6.</b> Etapas de la adhesión plaquetaria sobre el endotelio y las moléculas de adhesión que participan en cada una de ellas .....	10
<b>Figura 7.</b> Receptores, moléculas de adhesión y mecanismos moleculares implicados en la agregación plaquetaria .....	12
<b>Figura 8.</b> Moléculas de adhesión implicadas en la interacción plaqueta-leucocito .....	13
<b>Figura 9.</b> Cordón umbilical humano completo cuya vena se encuentra llena de colagenasa .....	15
<b>Figura 10.</b> Montaje de la cámara paralela de flujo .....	17
<b>Figura 11.</b> Montaje del sistema de cámara paralela de flujo en microscopio.....	18
<b>Figura 12.</b> Citómetro de flujo FACS Calibur.....	19
<b>Figura 13.</b> Identificación de las diferentes subpoblaciones leucocitarias y de la población de plaquetas a través del citómetro de flujo .....	20
<b>Figura 14.</b> Efecto de abacavir y carbovir-trifosfato sobre la adhesión de plaquetas sobre células endoteliales .....	22
<b>Figura 15.</b> Determinación del tipo celular implicado en la adhesión de plaquetas al endotelio inducida por abacavir o carbovir-trifosfato.....	23
<b>Figura 16.</b> Efecto de abacavir y carbovir-trifosfato sobre la adhesión de plaquetas sobre neutrófilos .....	24
<b>Figura 17.</b> Efecto de abacavir y carbovir-trifosfato sobre la adhesión de plaquetas sobre monocitos .....	25
<b>Figura 18.</b> Efecto de abacavir y carbovir-trifosfato sobre la expresión de CD62P (P-selectina) en plaquetas de PRP .....	26

## **ABREVIATURAS**

**ABC:** Abacavir

**ADH:** Alcohol deshidrogenasa

**ADK:** "Adenosine kinase"

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ADP:** Adenosina difosfato

**AMP:** Adenosina monofosfato

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosina trifosfato

**AZT:** Zidovudina

**cART:** Terapia antirretroviral combinada

**CBV-TP:** Carbovir trifosfato

**CCR5:** "C-C Chemokine C-C Ligand 5"

**CD11b/CD18:** "Macrophage 1 Antigen"

**CD4:** "cluster of cuadruple differentiation"

**CD41:** "Integrin alpha chain 2b"

**CD62P:** P-selectina

**Cmax:** Concentración plásmatica máxima

**CXCR4:** "C-X-C Chemokine Receptor Type-4"

**ddI:** Didanosina

**dNTP:** Desoxirribonucleótido trifosfato

**d4T:** Estavudina

**E.E.M.:** Error estándar de la media

**EBM-2:** "Endothelial cell basal medium-2"

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**FDA:** "Food and Drug Administration"

**FITC:** Fluoresceína isotiocianato

**FTC:** Emtricitabina

**GA:** "Gentamicine sulfate amphotericine B"

**gp41:** "Glycoprotein 41"

**GPIbA:** "Glycoprotein Ib platelet alpha subunit"

**GPIIb-IIIa:** "Glycoprotein IIb-IIIa"

**GUK1:** Guanilato quinasa

**HBSS:** "Hanks Balanced Salt Solution"

**hFGF-B:** "Human fibroblast growth factor-basic"

**HUVEC:** "Human Umbilical Vein Endothelial Cell"

**ICAM-1:** "Intercellular Cell Adhesion Molecule-1"

**ICAM-2:** "Intercellular Cell Adhesion Molecule-2"

**IF:** Inhibidores de fusión

**InInt:** Inhibidores de la integrasa

**IP:** Inhibidores de proteasa

**ITIAN:** Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido

**ITINAN:** Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido

**JAM-3:** "Junctional adhesion molecule-3"

**Mac-1:** "Macrophage 1 Antigen"

**PAF:** "Platelet Activating factor"

**PBS:** "Phosphate buffered saline"

**PCK1:** Fosfoenolpiruvato carboxilasa 1

**PE:** Ficoeritrina

**PGK1:** Fosfoglicerato quinasa 1

**PPP:** Plasma pobre en plaquetas

**PRP:** Plasma rico en plaquetas

**PSGL-1:** "P-selectin glycoprotein ligand-1"

**R<sup>3</sup>-IGF-1:** "Recombinant long R<sup>3</sup> Insuline-like growth factor-1"

**rhEGF:** "Recombinant human epidermal growth factor"

**SIDA:** Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

**TDF:** Tenofovir

**TNF- $\alpha$ :** "Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ "

**UGT:** uridina difosfato glucuronosiltransferasa

**VEGF:** "Vascular endothelial growth factor"

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**3TC:** Lamivudina



# I. INTRODUCCIÓN

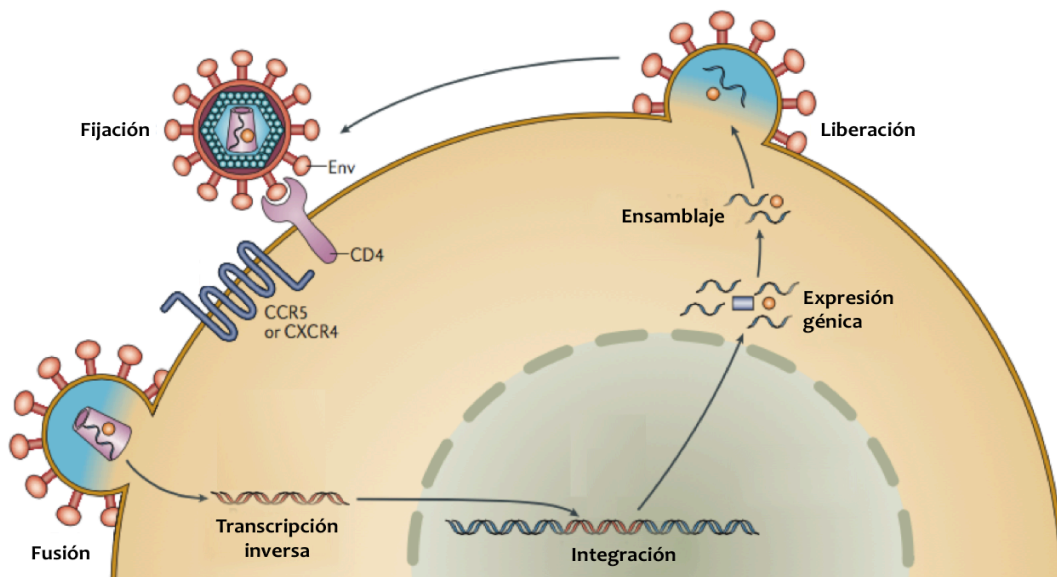
## 1. Infección y ciclo biológico del VIH

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus y es el agente causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), una de las pandemias virales más importantes en la actualidad (Freed, 2015). Este virus infecta a los linfocitos T CD4+, debido a que la entrada del virus a las células está mediada por la unión de la glicoproteína Env viral a CD4 y al co-receptor CCR5 o CXCR4, dos proteínas de superficie de la célula hospedadora (Choe *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996).

El ciclo biológico del VIH consta de las siguientes fases (Fig. 1) (Laskey & Siliciano, 2014):

- **Fijación:** es la primera etapa en la infección de las células. Se basa en el reconocimiento y acoplamiento de las proteínas de la envoltura del virión, la proteína Env con sus receptores presentes en los linfocitos T CD4+, los CD4. Este reconocimiento se produce gracias a los co-receptores propios de las células susceptibles de ser infectadas, CCR5 y CXCR4 que interaccionan con las proteínas superficiales del virus. Por tanto, únicamente van a ser sensibles a la infección aquellas células que expresen estos receptores, siendo este reconocimiento imprescindible para que el virus llegue a penetrar en la célula y continúe con el proceso de infección.
- **Fusión:** la envoltura lipídica del virus se fusiona con la membrana plasmática de la célula y se libera el contenido del virión en el interior de la célula hospedadora. Se eliminan las cubiertas proteicas, la cápside y la nucleocápside que protegen el ARN, que constituye el genoma viral, y sus proteínas asociadas. De esta forma, el ARN viral queda libre en el citoplasma de la célula estando listo para ser procesado.
- **Transcripción inversa del ARN viral:** el genoma viral se transcribe a ADNc (ADN complementario) monocatenario. Finalmente, dos moléculas de ADNc se asocian para formar una molécula de ADN.
- **Integración:** la cadena de ADN se transporta al núcleo de la célula hospedadora y gracias a la enzima integrasa, que procede del virión, se integra en el ADN celular donde se puede replicar de forma masiva, de forma controlada o permanecer latente.
- **Transcripción del ADN vírico:** se produce por los mecanismos normales de la célula. El resultado es un ARNm (ARN mensajero) complejo que debe ser procesado antes de que la información que contiene pueda servir para producir las proteínas virales correspondientes. Una vez procesado, el ARNm puede salir del núcleo hacia el citoplasma a través de los poros nucleares.

- **Traducción:** el ARNm ya procesado que se encuentra en el citoplasma de la célula hospedadora se traduce gracias a los ribosomas de la propia célula. La traducción no produce proteínas funcionales directamente, produce unas poliproteínas que deben ser procesadas.
- **Ensamblaje:** las poliproteínas son procesadas por la acción de las proteasas del VIH formando las proteínas constitutivas del virus. Estas proteínas se ensamblan, junto con el ARN proviral, para formar la cápside y el contenido del virión.
- **Liberación:** constituye el último paso, ocurre cuando los nucleoides víricos se aproximan a la membrana plasmática y se hacen envolver en una membrana que se acaba desprendiendo y formando un nuevo virión.



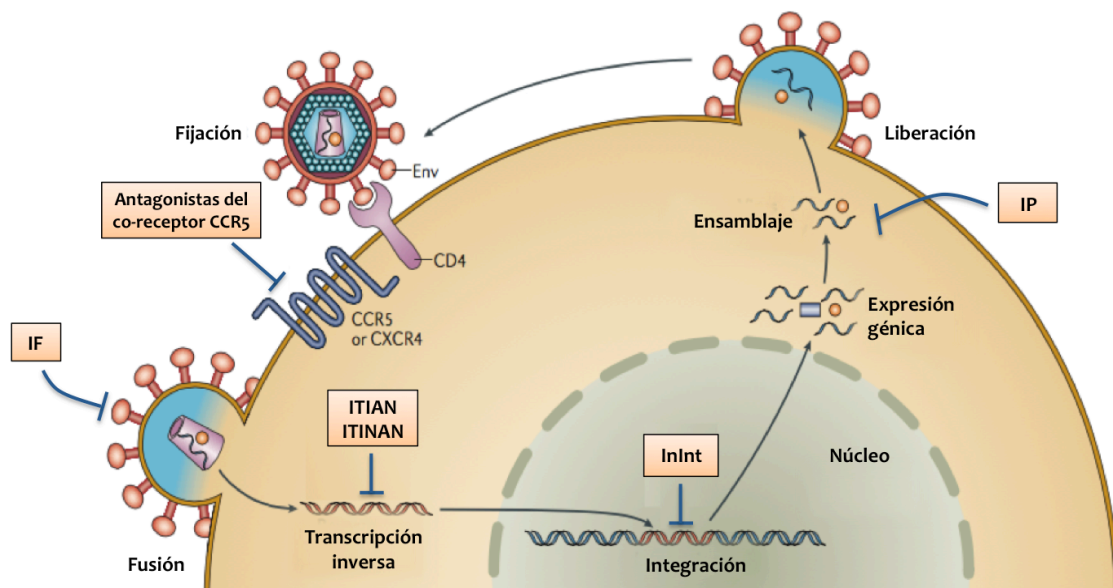
**Figura 1.** Ciclo biológico del VIH. (Adaptado de Laskey SB, Siliciano RF. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. Nat Rev Micro. Nature Publishing Group; 2014).

## 2. Fármacos antirretrovirales

La disponibilidad de diferentes fármacos activos frente al VIH ha modificado radicalmente la evolución de la infección del SIDA, con una reducción de su mortalidad y una eficacia progresiva para controlar la replicación del VIH (Bartlett *et al.*, 2006). Actualmente la combinación adecuada de diferentes fármacos antirretrovirales nos permite controlar la replicación viral y preservar o restaurar el sistema inmune en la gran mayoría de pacientes, de manera que la esperanza de vida se va aproximando cada vez más a la de la población general (Ribera *et al.*, 2011).

Hay seis tipos de fármacos antirretrovirales (Bailey & Fisher, 2008), dependiendo del lugar donde actúen en el ciclo biológico del virus (Fig. 2):

- 1) Antagonistas del co-receptor CCR5. Bloquean los receptores CCR5 en células inmunes y previenen que actúen como co-receptores en la fusión del VIH a la célula.
- 2) Inhibidores de la fusión (IF). Bloquean la proteína de superficie viral gp41 y previenen la entrada del material viral a la célula.
- 3) Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido (ITIAN). Bloquean la transcriptasa inversa viral de forma competitiva.
- 4) Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido (ITINAN). Bloquean la transcriptasa inversa viral de forma no competitiva.
- 5) Inhibidores de integrasa (InInt). Bloquean la integrasa viral y previenen la incorporación del ADN viral al genoma celular.
- 6) Inhibidores de proteasa (IP). Bloquean la proteasa viral.



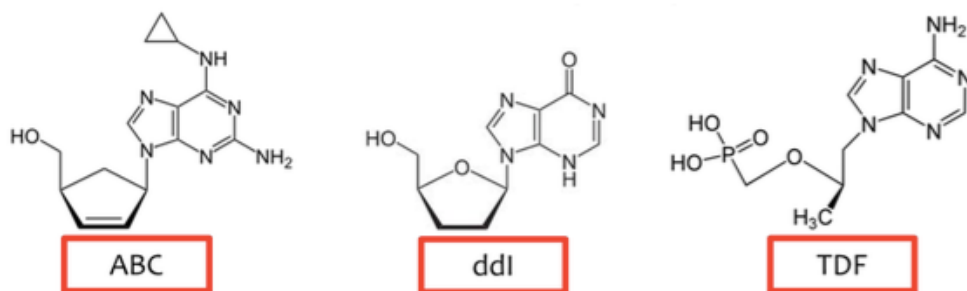
**Figura 2.** Ciclo biológico del VIH que muestra los diferentes sitios de acción sobre los que pueden actuar los diferentes fármacos antirretrovirales. (Adaptado de Laskey SB, Siliciano RF. A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nat Rev Micro.* Nature Publishing Group; 2014).

La terapia antirretroviral combinada (cART) se desarrolló en 1990 y fue capaz de suprimir la replicación del virus, transformando la infección por el VIH de una enfermedad progresiva mortal en una enfermedad crónica manejable. Esta terapia para ser eficaz consiste en la administración de al menos tres fármacos de manera simultánea. La terapia antirretroviral combinada estándar incluye dos ITIAN con un ITINAN, un IP o un InInt, siendo las combinaciones de ITIAN más empleadas las que incluyen abacavir (ABC)/ lamivudina (3TC) y tenofovir (TDF)/ emtricitabina (FTC) (Günthard *et al.*, 2014; Maartens *et al.*, 2014; Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2015).

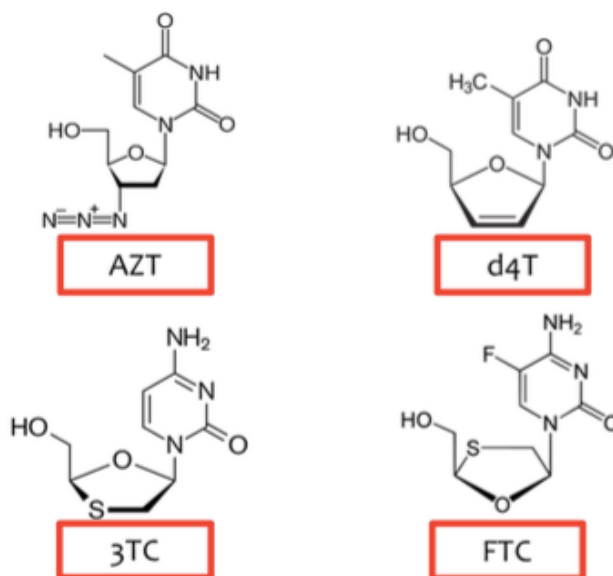
Los ITIAN fueron la primera familia de fármacos antirretrovirales que se desarrolló y en concreto fue zidovudina (AZT) el primer fármaco en ser aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del SIDA en 1987 (Broder, 2010). Actualmente hay siete ITIAN aprobados. Son derivados de las bases nitrogenadas (adenosina, citidina, guanosina y timidina) y se dividen, en función de su estructura química, en dos grandes grupos: análogos de bases púricas como ABC, didanosina (ddI) y TDF y análogos de bases de bases pirimidínicas como AZT, estavudina (d4T), 3TC y FTC (Fig. 3)(Piliero, 2004).

Una vez que estos fármacos han sido transportados al interior de las células se convierten en sus formas trifosfato mediante la timidina quinasa viral o una quinasa celular (Leung & Tse, 2007). Estas formas activas de ITIAN actúan en competencia con los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) de los cuales difieren en pequeños cambios en la molécula de ribosa, fundamentalmente en la carencia o modificación del extremo 3'OH, impidiendo la formación del enlace 3'-5' fosfodiéster entre la cadena de ADN en elongación y el nucleósido 5' trifosfato entrante (Ribera *et al.*, 2011). Por tanto, los ITIAN se incorporan a la cadena de ADN viral actuando como si fueran nucleósidos impidiendo la elongación, por lo que sería análogo a la inhibición de la transcriptasa inversa o de la ADN polimerasa viral y por tanto el virus no puede replicarse (Kakuda, 2000; Leung & Tse, 2007).

### ANÁLOGOS DE BASES PÚRICAS



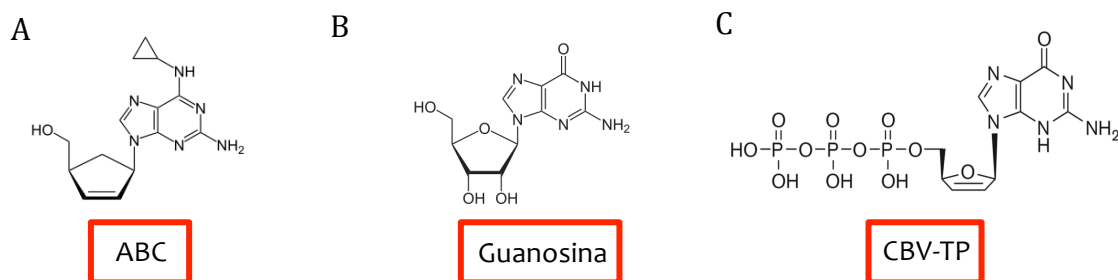
### ANÁLOGOS DE BASES PIRIMIDÍNICAS



**Figura 3.** Fármacos ITIAN. La figura muestra las estructuras químicas de los distintos fármacos ITIAN aprobados actualmente para el tratamiento del VIH. Análogos de bases púricas: Abacavir (ABC), Didanosina (ddI) y Tenofovir (TDF) y análogos de bases pirimidínicas: Zidovudina (AZT), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC).

## 2.1 Abacavir (ABC)

El fármaco antirretroviral ABC (Fig. 4A) es un análogo de guanosina (Fig. 4B) perteneciente al grupo de los ITIAN, inhibe la transcriptasa inversa y posee una actividad potente y selectiva frente al VIH (Daluge *et al.*, 1997).

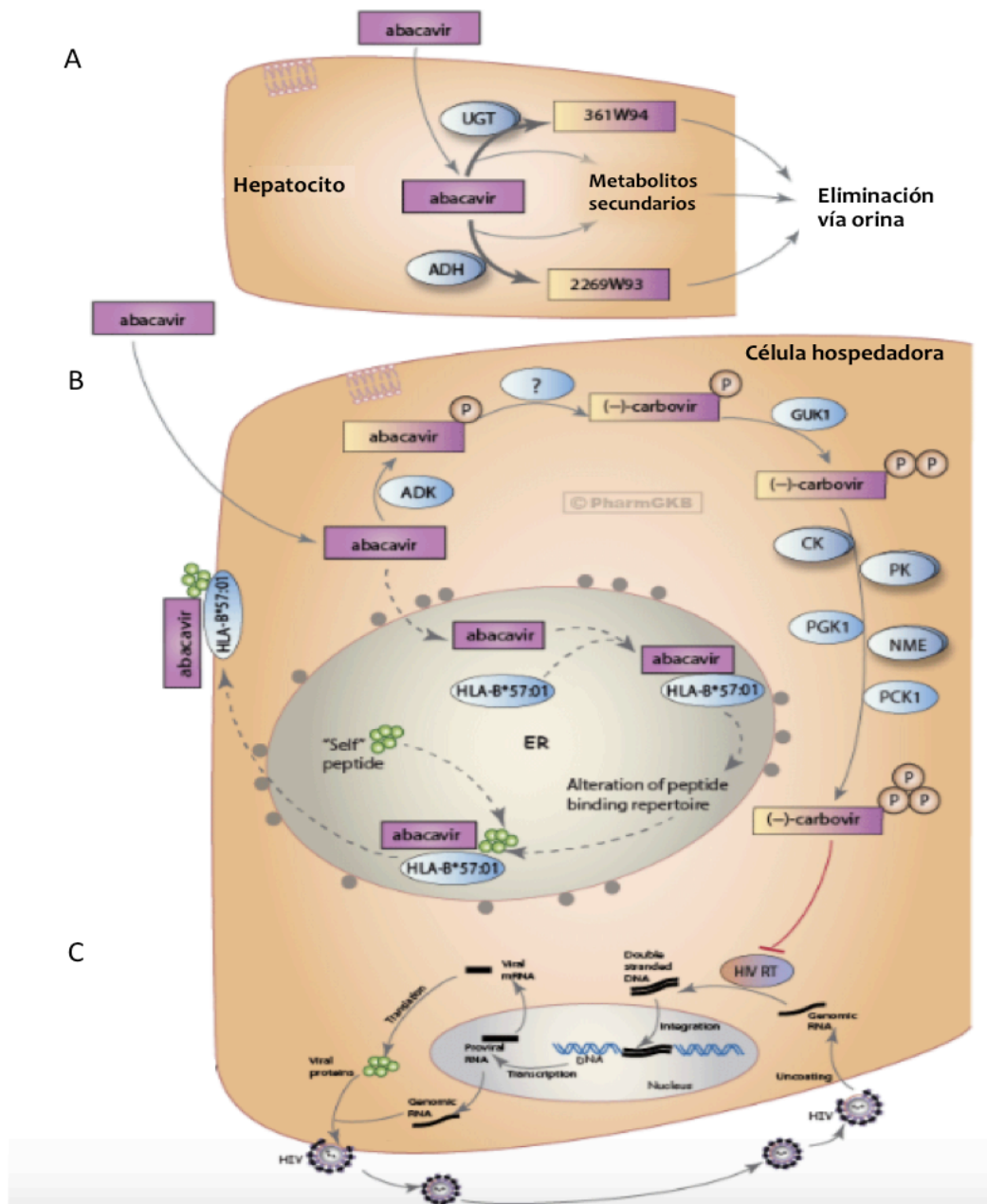


**Figura 4.** A. Estructura química de la molécula de abacavir (ABC). B. Estructura química de la molécula de guanosina. C. Estructura química de la molécula de carbovir-trifosfato (CBV-TP).

La sal hemisulfato de este compuesto ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento del VIH, como Ziagen™ (abacavir sulfato), y más adelante como parte de la triple combinación anti-VIH, Trizivir™ (AZT, 3TC y ABC) (Mahony *et al.*, 2004).

La molécula de ABC es lipofílica, aunque muestra una alta solubilidad en agua, lo que hace posible que pueda atravesar la membrana plasmática simplemente por difusión pasiva (Barbarino *et al.*, 2014). Una parte del fármaco que entra en el organismo es metabolizado en el citoplasma de los hepatocitos por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y la uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UGT). El metabolismo debido a la ADH da como resultado un metabolito carboxilado inactivo y con el metabolismo de la UGT se obtiene un metabolito glucurónido inactivo (Barbarino *et al.*, 2014; Grilo *et al.*, 2013; McDowell *et al.*, 1999), que después son excretados en la orina (Fig. 5A). Mientras, la parte que no se metaboliza en los hepatocitos llega a las células infectadas, donde mediante procesos anabólicos (en los que participan una serie de enzimas intracelulares) se convierte en su metabolito farmacológicamente activo. Inicialmente ABC es metabolizado a abacavir 5'-monofosfato por la enzima adenosina fosfotransferasa, codificada por el gen ADK. A continuación, se produce la desaminación por una enzima citosólica desconocida a (-)-carbovir 5'-monofosfato (Faletto *et al.*, 1997). (-)-Carbovir 5'-monofosfato más adelante se convierte en carbovir 5'-difosfato por la enzima guanilato quinasa (GUK1), que es estereoselectiva por el enantiómero (-) de carbovir 5'-monofosfato. Carbovir 5'-difosfato se convierte después en la forma activa 5'-trifosfato (Fig. 4C) por varias enzimas quinasas celulares. Estas incluyen creatín quinasas, piruvato quinasas, nucleósido difosfato quinasas, fosfoglicerato quinasa (PGK1) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PCK1) (Fig. 5B) (Barbarino *et al.*, 2014; Grilo *et al.*, 2013).

ABC también puede convertirse a carbovir 5'-monofosfato por otras rutas, como puede ser la transformación en carbovir seguida de la fosforilación a carbovir 5'-monofosfato por una inosina fosfotransferasa (Faletto *et al.*, 1997).



**Figura 5.** Representación esquemática del metabolismo de abacavir: A. eliminación de abacavir, B. transformación a carbovir-trifosfato y C. mecanismo de acción de carbovir-trifosfato sobre la replicación del VIH. (Adaptado de Barbarino JM, Kroetz DL, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: abacavir pathway. May, 2014).

## 2.2 Carbovir-trifosfato (CBV-TP)

ABC comparte similitud estructural con carbovir, el primer nucleósido carbólico que se demostró que tenía actividad anti-VIH (Vince *et al.*, 1988), diferenciándose en la posición 6 del anillo de purina, dónde ABC contiene un resto ciclopropilamino en lugar del lactamo, funcionalizando carbovir (Mahony *et al.*, 2004).

Este compuesto emergió como el más activo de una serie de nucleósidos carbólicos, caracterizado por tener un grupo metileno en lugar del anillo unido a un grupo alcohol, natural de los nucleósidos. Esta sustitución le hace resistente a la hidrólisis del enlace glicosídico conservando su potencial como inhibidor de la transcriptasa inversa (Anderson & Chiang, 1990).

Carbovir-trifosfato (CBV-TP) es un sustrato en la síntesis de ADN de la transcriptasa inversa del VIH ya sea de una hebra de ARN o de una hebra de ADN y la incorporación de carbovir 5' monofosfato en una cadena de ADN por la transcriptasa inversa del VIH resulta en la terminación de la síntesis de la hebra (Fig. 5C) (Parker *et al.*, 1991). Una característica importante de CBV-TP es la ausencia de actividad frente a ADN polimerasas humanas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Parker *et al.*, 1991; White *et al.*, 1989).

### **3. Efectos de la terapia antirretroviral en el sistema cardiovascular**

Aunque la esperanza de vida de las personas infectadas con VIH ha aumentado desde que se introdujo la cART, la supervivencia aún está lejos de la población general ("The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration", 2008). En la práctica, los prometedores avances que se esperaban de cART han sido difíciles de conseguir debido a los efectos adversos de los fármacos en órganos como el corazón y el riñón (Choi *et al.*, 2011).

La mortalidad en pacientes con VIH no asociada a SIDA está causada principalmente por cáncer (23,5%), enfermedades cardiovasculares (15,7%) y enfermedades hepáticas (14,1%) (Maartens *et al.*, 2014). Por tanto, la enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de muerte entre los pacientes infectados con VIH (Hooshyar *et al.*, 2007). El aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes con VIH ha sido comúnmente atribuido a una mayor prevalencia de factores de riesgo tradicionales y a efectos inflamatorios del propio virus (Grinspoon *et al.*, 2008; Triant, 2012). Sin embargo, dado que la administración de la terapia antirretroviral es de por vida y el progresivo aumento de la esperanza de vida de la población infectada con VIH, existe un creciente interés en esclarecer el impacto de los fármacos empleados en el tratamiento de la infección por VIH en el sistema cardiovascular. El debate principal involucra a ABC, análogo de guanosina, perteneciente a la familia de los ITIAN, ampliamente empleado en la terapia antirretroviral. En 2005, empezaron a aparecer estudios que asociaban el uso de este fármaco con una mayor incidencia de infarto de miocardio. Sin embargo, fue después de la publicación en 2008 por "The Data collection and Adverse events of anti-HIV Drugs study group" (D:A:D) cuando se relacionó directamente la exposición a ABC con un aumento en la incidencia de infarto de miocardio, de forma que el riesgo se reconoció y se amplió incluyendo la ddi (otro ITIAN análogo de purina que comparte una estrecha semejanza química con ABC) como otro fármaco causante. Estudios posteriores confirmaron esta relación (Friis-Moller *et al.*, 2003; Lundgren *et al.*, 2008; Sabin *et al.*, 2016), mientras que otros no lo hicieron (Cutrell *et al.*, 2008; Brothers *et al.*, 2009; Bedimo *et al.*, 2011; Cruciani *et al.*, 2011; Ribaud *et al.*, 2011).



Sin embargo, y a pesar de la ausencia de un consenso, las principales guías clínicas actualmente descartan el uso de ABC cuando hay cualquier posibilidad de enfermedad cardiovascular (Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2015). El debate anteriormente mencionado ha sido fuertemente impulsado por la falta de un mecanismo de acción que pueda explicar la toxicidad cardiovascular que produce ABC.

Se ha demostrado también que ABC produce disminución en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células endoteliales pulmonares humanas (Wang *et al.*, 2009). Estas situaciones pueden dar lugar a disfunción vascular y acumulación linfocitaria. El aumento de ERO inicia y amplifica la respuesta inflamatoria a través del reclutamiento de leucocitos y del aumento de la expresión de P-selectina y de  $\beta 2$  integrinas, así como del aumento de la liberación del factor activador de plaquetas (PAF) (Álvarez *et al.*, 2002; Álvarez & Sanz, 2001).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la capacidad de ABC para provocar la acumulación de leucocitos sobre el endotelio venular y arterial, acción reproducida por ddl, pero no por los ITIAN análogos de pirimidina (3TC, AZT, FTC) o por TDF (De Pablo *et al.*, 2010, De Pablo *et al.*, 2012, De Pablo *et al.*, 2013). Mediadores purinérgicos tales como ATP y algunos de sus metabolitos (ADP, AMP, etc.) son las principales moléculas de señalización paracrina capaces de desencadenar mecanismos vasculares protrombóticos y proinflamatorios, que implican el tráfico de leucocitos, la activación plaquetaria y la formación de la placa aterosclerótica, mediante la interacción con receptores de nucleótidos P2- situados en las células endoteliales, leucocitos y plaquetas. Dada la similitud estructural entre ABC y purinas endógenas, se sugirió que la interferencia con las vías de señalización de purinas a través de receptores de ATP-P2X7, situados principalmente en los leucocitos, podría ser responsable de los efectos vasculares de ABC (Esplugues *et al.*, 2016).

Las interacciones leucocito-endotelio son el primer paso en la inflamación vascular, aunque las plaquetas son necesarias para la inducción de la trombosis. Por lo tanto, las plaquetas pueden ser clave en el mecanismo por el cual ABC produce toxicidad vascular y aumenta el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.

#### **4. Proceso inflamatorio: función plaquetaria**

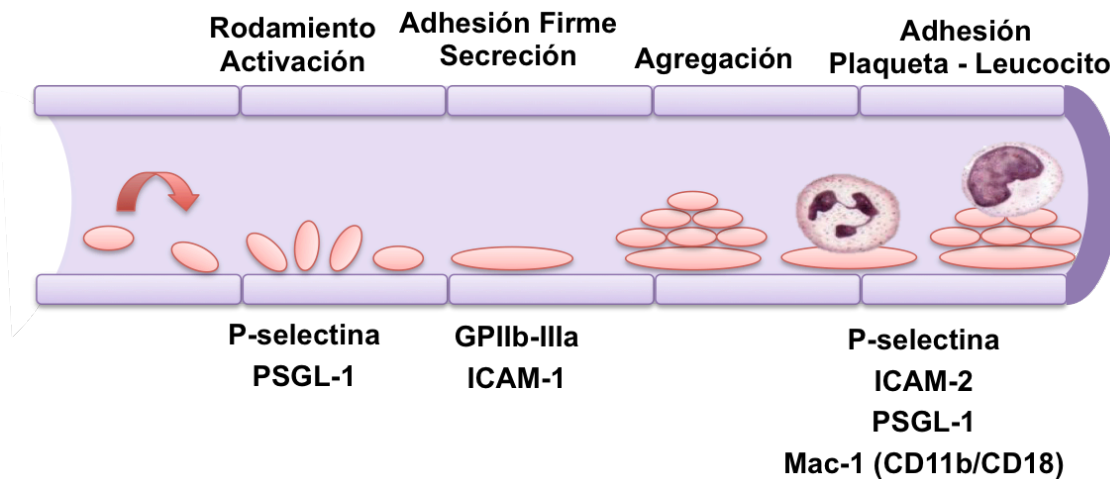
La formación de trombos dependiente de plaquetas es un evento clave en la patogénesis del infarto de miocardio. Las plaquetas circulantes no interactúan con la superficie intacta de los vasos, sin embargo éstas se adhieren rápidamente a células endoteliales dañadas, y rápidamente reclutan nuevas plaquetas, produciéndose la agregación, y diferentes tipos leucocitarios. De esta forma se inicia el proceso de obstrucción trombótica que conduce a la isquemia e infarto de miocardio (Gawaz, 2004).

Además de su papel en la trombosis las plaquetas tienen un papel crítico en la inflamación (Klinger & Jelkmann, 2002). La quimiotaxis es un mecanismo central para

reclutar células inflamatorias a los sitios de daño tisular o de reparación. Durante la adhesión las plaquetas se activan y liberan en el citoplasma una variedad de factores quimiotácticos que se encuentran almacenados en sus gránulos o que se han sintetizado después de la estimulación de las plaquetas (Rendu & Brohard-Bohn, 2001). De esta forma se estimula la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las plaquetas, que son capaces de atraer a otras células sanguíneas en circulación, y también modular las propiedades quimiotácticas de otras células incluyendo leucocitos (Weyrich *et al.*, 1996) y endotelio (Gawaz *et al.*, 1998; Henn *et al.*, 1998).

#### 4.1 Interacción plaqueta-endotelio

El endotelio normal en reposo tiene una superficie no adherente y no trombogénica que previene la extravasación de las células sanguíneas en circulación, mientras que las células del endotelio activadas son pro-adhesivas y promueven la adhesión de las plaquetas circulantes. La adhesión de las plaquetas al endotelio intacto pero activado implica que en la superficie de las células haya unos receptores dependientes del proceso que permiten capturar las plaquetas en circulación hacia la pared de los vasos incluso bajo un alto estrés debido a la circulación sanguínea. La adhesión de las plaquetas a la superficie del endotelio vascular es un proceso con diferentes pasos, en los que las plaquetas se sitúan sobre la pared vascular, seguido del rodamiento de las plaquetas y la subsiguiente adhesión firme al endotelio (Fig. 6) (Gawaz, 2004).



**Figura 6.** Etapas de la adhesión plaquetaria sobre el endotelio y moléculas de adhesión que participan en cada una de ellas.

El contacto débil inicial entre las plaquetas circulantes y el endotelio está mediado por selectinas, presentes tanto en las células endoteliales como en las plaquetas (Johnson *et al.*, 1995). P-selectina (CD62P) se expresa rápidamente en la superficie endotelial en respuesta a un estímulo inflamatorio por translocación desde las membranas de los gránulos de almacenaje (cuerpos Weibel-Palade) a la membrana plasmática. Además, P-selectina se almacena en los gránulos- $\alpha$  de las plaquetas y puede rápidamente translocarse a la superficie de las plaquetas bajo activación de las mismas (Gawaz, 2004).

La glicoproteína que se asocia con P-selectina, PSGL-1 (“P-selectin glycoprotein ligand-1”), está presente tanto en células endoteliales como en plaquetas y leucocitos, por lo que media las interacciones plaqueta-endotelio, plaqueta-leucocito y también leucocito-endotelio *in vitro* e *in vivo* (Frenette *et al.*, 2000, Wagner & Frenette, 2008).

Las interacciones selectina-ligando no son suficientes para promover la adhesión firme de las plaquetas en el torrente sanguíneo. Esto implica que durante el rodamiento, se tienen que formar nuevas uniones que se caractericen por tener tasas de disociación bajas para promover la adhesión irreversible. Estas interacciones más estrechas entre las plaquetas y la pared vascular implican la interacción con las integrinas del endotelio, como ICAM-1 (“Intercellular Cell Adhesion Molecule-1”) (Gawaz, 2004).

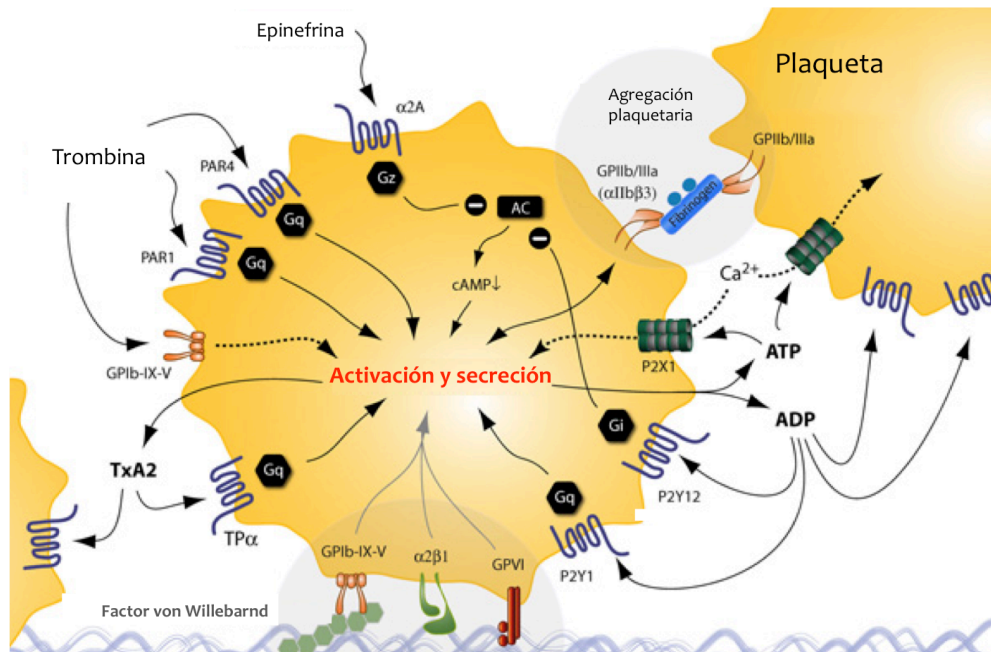
## 4.2 Interacción plaqueta-plaqueta: agregación

La agregación implica la adhesión plaqueta-plaqueta. Tras la adhesión, las plaquetas se activan por una serie de agonistas como ADP, colágeno, tromboxano, trombina y epinefrina presentes en los sitios de daño vascular.

La acción de esos agonistas, mediada por sus respectivos receptores con la consecuente activación de sus mecanismos moleculares específicos termina desencadenando, si el estímulo es importante y/o múltiple, un único conjunto de sucesos; incremento de calcio intracelular, liberación del contenido de los gránulos y el cambio de forma de las plaquetas, en resumen la agregación plaquetaria

La molécula de adhesión principal implicada en la agregación plaquetaria es la proteína de membrana denominada complejo glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) (Fig. 7). GPIIb-IIIa es un receptor de integrina presente en alta densidad en las plaquetas, tanto en la membrana plasmática como en los gránulos- $\alpha$  (Niiya *et al.*, 1987). El fibrinógeno actúa como un puente de unión entre dos moléculas de GPIIb-IIIa en las plaquetas adyacentes (Varga-Szabo *et al.*, 2008). Esta es la vía final común de la agregación plaquetaria inducida por agonistas químicos de plaquetas.

El ADP es un mediador plaquetario que bien de forma externa a la plaqueta o interna como parte del contenido de los gránulos densos tiene un papel clave en la activación plaquetaria y consecuente agregación. Se conocen dos receptores para el ADP en la plaqueta, uno acoplado a la proteína Gq (P2Y<sub>1</sub>) y otro acoplado a Gi (P2Y<sub>12</sub>), que es esencial para la hemostasia primaria (Kahner *et al.*, 2006). Ambos receptores actúan de modo sinérgico en la activación de las plaquetas (Fig. 7).



**Figura 7.** Receptores, moléculas de adhesión y mecanismos moleculares implicados en la agregación plaquetaria. (Adaptado de PLATELETS | PLATELETS.SE, 2016).

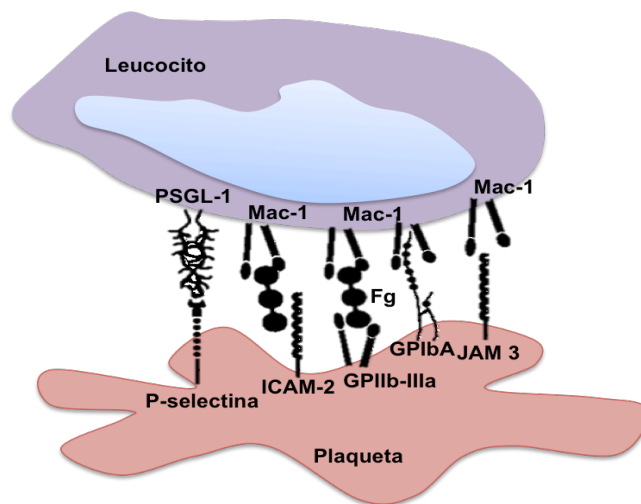
### 4.3 Interacción plaqueta-leucocito

La adhesión de las plaquetas al endotelio o a la matriz subendotelial induce la activación plaquetaria y la liberación de sustancias que son capaces de causar quimiotaxis y migración de leucocitos en circulación hacia el lugar donde se ha producido la acumulación plaquetaria (Springer, 1994).

La adhesión de los leucocitos a las plaquetas implica la expresión en la superficie de P-selectina en las plaquetas activadas y su unión a PSGL-1, presente en neutrófilos y monocitos (Gardiner *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la unión de los leucocitos, y posteriormente la adhesión de los leucocitos sobre monocapas de plaquetas activadas (Fig. 7) se produce a través de la acción secuencial de P-selectina e ICAM-2 (“Intercellular Cell Adhesion Molecule-2”) de las plaquetas por la unión a sus ligandos en los leucocitos, PSGL-1 y “Macrophage 1 Antigen” (Mac-1, CD11b/CD18) respectivamente (Diacovo *et al.*, 1996). Esto sugiere que las plaquetas ancladas a la pared de los vasos pueden estar promoviendo el reclutamiento de los leucocitos. Además, la interacción plaqueta-leucocito dependiente de P-selectina/PSGL-1 lleva a las plaquetas a estar en contacto estrecho con los neutrófilos y puede estar facilitando su activación por los mediadores pro-inflamatorios liberados de las plaquetas (Gawaz, 2004).

Por lo tanto, las plaquetas ya sea inmobilizadas en una superficie o activadas en suspensión expresan una maquinaria completa para reclutar leucocitos (Gawaz, 2004):

- a) P-selectina de plaquetas es un mediador del contacto inicial (débil)
- b) La interacción de P-selectina de plaquetas con su ligando PSGL-1 en los leucocitos induce eventos relevantes para la activación de Mac-1.
- c) Mac-1 activado en los leucocitos permite la señalización y refuerza la adhesión firme plaqueta-leucocito mediante la unión de los ligandos (ICAM-2, fibrinógeno unido a GPIIb-IIIa, glicoproteína IbA (GPIbA), JAM-3) presentes en la superficie de las plaquetas (Fig. 8).



**Figura 8.** Moléculas de adhesión en la interacción plaqueta-leucocito.

## II. OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación ha caracterizado los efectos de ABC sobre la función plaquetaria, es decir, la acción del fármaco en las diferentes fases de la formación del trombo que dependen de plaquetas. Así, se ha observado que el tratamiento con ABC (5 µg/mL) induce la interacción plaqueta-endotelio y que el tipo celular sobre el que actuaría ABC son las células endoteliales. También se ha observado que ABC produce la interacción de plaquetas a neutrófilos y a monocitos. Sin embargo, ABC no induce activación plaquetaria (no produce aumento de la expresión de P-selectina).

Una posibilidad es que estos efectos sean debidos a la acción del metabolito activo de ABC, CBV-TP. Por tanto, el objetivo general del presente trabajo es caracterizar los efectos de CBV-TP sobre las diferentes fases de la función plaquetaria con la finalidad de dilucidar si los efectos que se ha observado que provoca ABC sobre la función plaquetaria podrían ser debidos a CBV-TP, lo que ayudaría a explicar el mecanismo por el cual ABC puede producir toxicidad vascular.

En particular, se abordan los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de CBV-TP sobre la interacción plaqueta-endotelio *in vitro*, así como el tipo celular implicado en dicho proceso.
2. Estudiar las acciones de CBV-TP sobre la interacción plaqueta-leucocito *in vitro*.
3. Analizar los efectos de CBV-TP sobre la activación plaquetaria *in vitro*. En concreto, sobre la expresión de P-selectina (CD62P) en plaquetas.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Métodos

##### 1.1 Aislamiento y cultivo de células endoteliales

Se emplean células de venas de cordón umbilical humano (HUVEC). Las HUVEC se extraen de venas de cordones umbilicales humanos frescos procedentes de donantes sanos del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Para la extracción de estas células se trabaja con el cordón umbilical completo (Fig. 9) y se obtienen por tratamiento con colagenasa, como se ha descrito previamente (Orden *et al.*, 2013). Se lavan los vasos para eliminar los restos de sangre mediante una solución caliente de tampón de fosfato salino (PBS). Se introduce en la vena del cordón colagenasa (1 mg/mL) y se mantiene en el incubador a 37°C durante 17 minutos. Una vez ha transcurrido este período de tiempo, los cordones se masajean suavemente para separar las células endoteliales de la pared del vaso y el contenido se recoge y se centrifuga. El precipitado obtenido se resuspende en “Endotelial Cell Basal Medium-2” (EBM-2) [suplementado con Suero Fetal Bovino (2% v/v), Hidrocortisona (0,4% v/v), “Human Fibroblast Growth Factor-Basic” (hFGF-B, 0,4% v/v), “Vascular Endotelial Growth Factor” (VEGF, 0,1% v/v), “Recombinant Long R<sup>3</sup> Insulin-Like Growth Factor-1” (R3-IGF-1, 0,1% v/v), Ácido ascórbico (0,1% v/v), “Human Recombinant Epidermal Growth Factor” (rhEGF, 0,1% v/v), “Gentamicine Sulfate Amphotericine B” (GA-1000, 0,1% v/v), Heparina (0,1% v/v), Penicilina (50 unidades/mL), Estreptomicina (50 µg/mL) y Fungizona (2,5 µg/mL)] y se deposita en un frasco de cultivo celular T25 donde las HUVEC se cultivan hasta alcanzar el 100% de confluencia.



**Figura 9.** Cordón umbilical humano completo cuya vena se encuentra llena de colagenasa.

Los cultivos primarios se despegan con tripsina y se transfieren a placas de cultivo de 6 pocillos con cubre-objetos de cristal de 25 mm con un revestimiento de fibronectina (5 µg/mL) donde se cultivan hasta alcanzar el 100% de confluencia (~48 horas) para los experimentos de adhesión *in vitro* en cámara paralela de flujo (Ver 1.4 Ensayo de adhesión en cámara paralela de flujo).

Las células se mantienen en el incubador de cultivo celular a 37°C, en una atmósfera húmeda de 95% aire/ 5% CO<sub>2</sub>.

## **1.2 Extracción de plasma rico en plaquetas (PRP) y preparación de plaquetas lavadas humanas**

Se emplea sangre de donantes sanos procedente del Hospital Clínico Universitario de Valencia que no han tomado ningún fármaco conocido que afecte a la función plaquetaria en los 14 días anteriores a la donación.

El plasma rico en plaquetas (PRP) y las plaquetas lavadas se preparan a partir de la sangre entera recogida en tubos con citrato de sodio como anticoagulante, mediante un método de extracción con prostaciclina (Radomski & Moncada, 1983).

Estos tubos se centrifugan a 220 g durante 10 minutos (con aceleración y desaceleración suave) para obtener el PRP. Para obtener las plaquetas lavadas, el PRP se centrifuga a 700 g durante 10 min y el plasma pobre en plaquetas (PPP) se elimina. El precipitado de plaquetas, después de lavar 2 veces con tampón salino, se resuspende suavemente con tampón salino hasta alcanzar una concentración final de  $1 \times 10^7$  plaquetas/mL.

Todos los pasos de la extracción se llevan a cabo en presencia de prostaciclina para evitar la activación mecánica de las plaquetas.

## **1.3 Protocolo experimental de tratamiento**

En pacientes adultos la pauta posológica de ABC es de 300 mg/12h o 600 mg/24h, originándose una concentración plásmatica máxima ( $C_{max}$ ) de 4,85  $\mu\text{g/mL}$ . Debido a esto se seleccionó una concentración de ABC de 5  $\mu\text{g/mL}$  y concentraciones de CBV-TP entre 1 – 25  $\mu\text{g/mL}$ , valores que mimetizan las concentraciones de ABC y CBV-TP en pacientes que reciben este tratamiento (Piliero, 2004; Yuen *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que la conversión de ABC a CBV-TP es inferior al 100% la concentración comparable con ABC 5  $\mu\text{g/mL}$  sería CBV-TP 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Se tratan los diferentes tipos celulares (HUVEC, leucocitos y/o plaquetas) de forma independiente con ABC (5  $\mu\text{g/mL}$ ), con concentraciones crecientes de CBV-TP (1 – 25  $\mu\text{g/mL}$ ), o con el vehículo control (agua estéril) durante 4 h (HUVEC) y 1 h (plaquetas y leucocitos), a 37°C. Como control positivo se empleó TNF- $\alpha$  (25 ng/mL, 4h) para células endoteliales y ADP (5  $\mu\text{mol/L}$ , 1h) para plaquetas y leucocitos. En el caso de los leucocitos se trata la sangre entera y en el caso de las plaquetas se trata el PRP o la sangre entera.

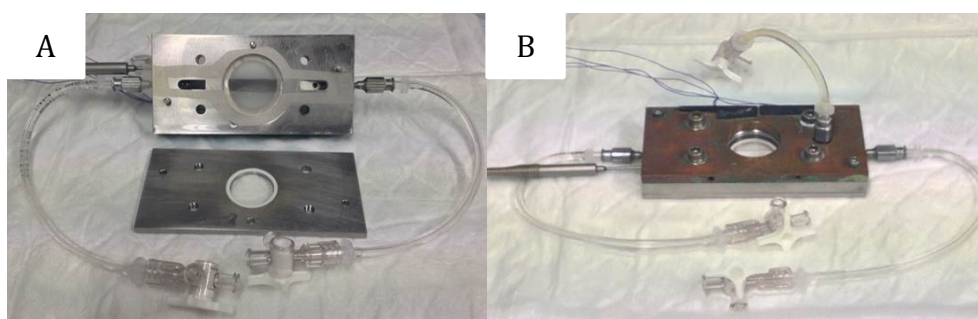


## 1.4 Ensayo de adhesión en cámara paralela de flujo

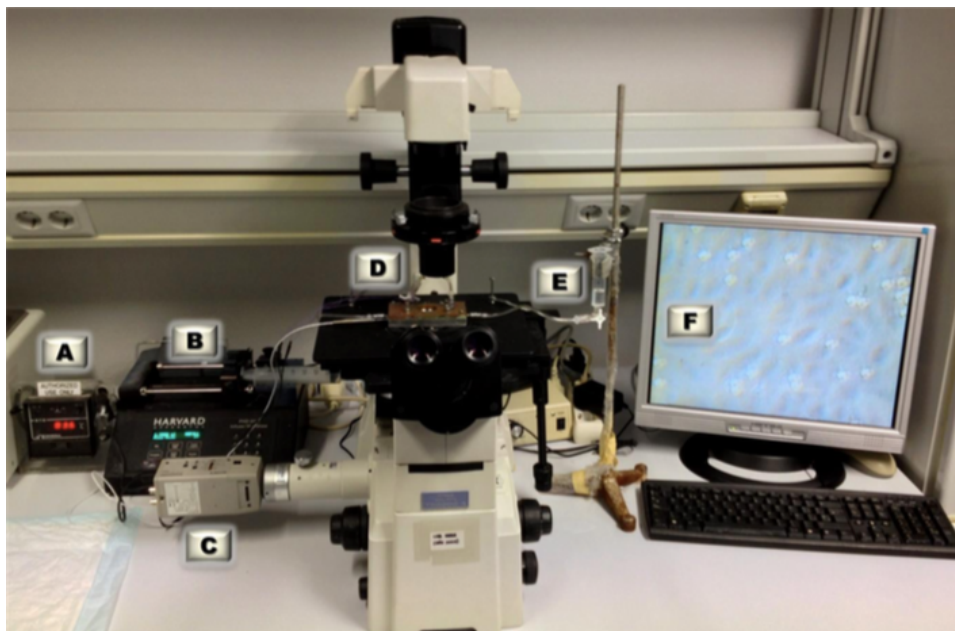
Se emplean células HUVEC sembradas en cubre-objetos de cristal circulares de 25 mm de diámetro pretratados con fibronectina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y plaquetas lavadas extraídas de sangre de donantes sanos.

El modelo *in vitro* de cámara paralela de flujo ya ha sido descrito en detalle (Lagadec *et al.*, 2003; Orden *et al.*, 2013). Los cubre-objetos de vidrio que contienen monocapas confluentes de HUVEC se colocan en un hueco circular en la placa inferior de la cámara de flujo (mantenido a 37°C) donde una parte de la monocapa (5 x 25 mm) se expone al flujo (Fig. 10). La cámara entera se monta sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S) equipado con un sistema de Epi-Fluorescencia y conectado a una cámara de vídeo (Sony Exware HAD) (Fig. 11). Los experimentos se llevan a cabo empleando el objetivo x40, pudiéndose así observar el flujo de plaquetas y su interacción con la monocapa endotelial.

Para la visualización directa de las interacciones de las plaquetas con las células endoteliales, las plaquetas lavadas se incuban durante 30 minutos a 37°C con un anticuerpo anti-CD41 (que marca específicamente las plaquetas) conjugado con Alexa@488 siguiendo las instrucciones del fabricante y se resuspenden para conseguir una concentración final de 2,5 x 10<sup>6</sup> plaquetas/mL. Las plaquetas lavadas se perfunden sobre la monocapa de HUVEC a una velocidad controlada de 0,36 mL/min (con una tensión de cizalla estimada de 0,7 dinas/cm<sup>2</sup>). Una ventana de cristal en la placa superior de la cámara permite el examen microscópico directo de la monocapa expuesta al flujo. Pasados 5 minutos de perfusión de plaquetas, los cubre-objetos se lavan con 4 mL de tampón de solución salina para eliminar las plaquetas no adheridas de la cámara. Se registran las imágenes de al menos 5 campos independientes por experimento, en campo claro y en fluorescencia y se analizan mediante el recuento del número de plaquetas unidas a la superficie del endotelio.



**Figura 10.** Montaje de la cámara paralela de flujo, A: cámara abierta, B: cámara cerrada. La cámara posee una hendidura circular en la que se inserta el cubre-objetos circular con las células endoteliales. Las conexiones permiten que se perfunden las plaquetas a través de la cámara de flujo.



**Figura 11.** Montaje del sistema de cámara paralela de flujo en microscopio. A: Regulador de temperatura, B: Bomba de infusión, C: Videocámara, D: Cámara de flujo, E: Jeringa con suspensión de plaquetas (PRP), F: Monitor de ordenador conectado a la videocámara.

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para determinar el tipo celular involucrado en la interacción plaqueta-endotelio inducida por ABC y CBV-TP, además de tratar tanto HUVEC como plaquetas con ABC o CBV-TP, ambos tipos celulares fueron tratados con ABC o CBV-TP individualmente, es decir, sólo fueron tratados las HUVEC o sólo las plaquetas (Tabla 1), lo que permitirá esclarecer sobre que células actúa el fármaco para que se de esta interacción. Para llevar acabo este ensayo el tratamiento se realiza con ABC 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o con CBV-TP 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con el vehículo o con el control positivo.

**Tabla 1.** Combinaciones de tratamiento para determinar el tipo celular implicado en la interacción plaqueta-endotelio inducida por abacavir y carbovir-trifosfato.

		CONTROLES		TRATAMIENTOS CON ABC			TRATAMIENTOS CON CBV-TP		
<b>Plaquetas</b>	Vehículo	ADP	ABC	Vehículo	ABC	CBV-TP	Vehículo	CBV-TP	
	<b>HUVEC</b>	TNF- $\alpha$	ABC	ABC	Vehículo	CBV-TP	CBV-TP	Vehículo	

## 1.5 Análisis de la interacción plaqueta-leucocito

La unión de plaquetas a las distintas poblaciones leucocitarias se evalúa mediante citometría de flujo (Ibiza *et al.*, 2009) (FACS Calibur, BD Biosciences) (Fig. 12).



**Figura 12.** Citómetro de flujo FACS Calibur.

Este sistema permite identificar y clasificar las células en base a sus características de tamaño y granulosidad. Se analizan las diferentes subpoblaciones de leucocitos: neutrófilos, monocitos y linfocitos (Fig. 13A). La mediana de la intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo CD41-PE (marcador específico de plaquetas) se emplea como marcador para determinar la presencia de plaquetas en cada una de estas subpoblaciones, analizándose 10.000 eventos por muestra.

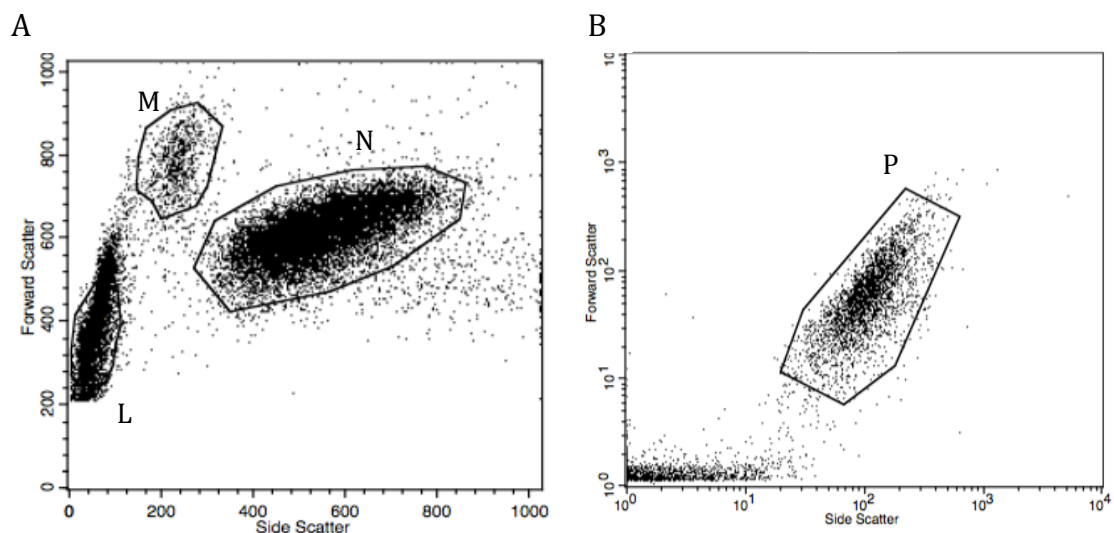
### PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Una vez haya transcurrido el periodo de incubación con los diferentes tratamientos, 40  $\mu$ L de sangre entera se incuban en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos con el anticuerpo CD41-PE a saturación. Tras la incubación con el anticuerpo, las muestras se diluyen con 500  $\mu$ L de solución de lisis y se conservan a 4°C durante 10 minutos para que se produzca la lisis de los glóbulos rojos antes de cuantificar las muestras en el citómetro de flujo.

## 1.6 Determinación de la activación plaquetaria mediante el análisis de la expresión de la molécula de adhesión P-selectina

Para analizar la activación plaquetaria se evalúa la expresión de la molécula de adhesión de plaquetas P-selectina, y se emplea la citometría de flujo (Ibiza *et al.*, 2009) (FACS Calibur, BD Biosciences) (Fig. 12).

En este caso también la población de plaquetas se identifica en base a sus características de tamaño y granulosidad (Fig. 13B). La expresión de P-Selectina, marcador de activación plaquetaria, se analiza utilizando el anticuerpo CD62P-FITC. La mediana de la intensidad de fluorescencia se emplea como marcador para determinar la expresión de P-selectina, analizándose 10.000 eventos por muestra.



**Figura 13.** Identificación de las diferentes subpoblaciones leucocitarias y de la población de plaquetas a través del citómetro de flujo. Se muestran dos histogramas representativos de las diferentes poblaciones leucocitarias (A) y plaquetaria (B) separadas e identificadas en función de sus características de tamaño ("forward scatter") y granulosidad ("side scatter") por el citómetro de flujo. N: neutrófilos. M: monocitos. L: linfocitos. P: plaquetas.

### PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Tras la incubación con los diferentes tratamientos, 10  $\mu$ L de PRP se diluyen con 90  $\mu$ L de HBSS (sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) y se incuban en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos con el anticuerpo CD62P-FITC a saturación. Tras esta incubación, las muestras se diluyen con 1 mL de HBSS y se analiza en el citómetro de flujo.

## 2. Materiales

Los reactivos, anticuerpos y fármacos antirretrovirales utilizados se han obtenido de las casas comerciales que se indican en la tabla 2.

**Tabla 2.** Reactivos, anticuerpos y fármacos antirretrovirales

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
EBM-2	Lonza
HBSS	
TNF- $\alpha$	Sigma Chemical Co
Fibronectina	
Cloruro sódico al 0,9% (Tampón salino)	
Prostaciclina	
ADP	
Cubre-objetos de cristal de 25 mm de diámetro	Nunc
PBS	Gibco
Colagenasa	
Tripsina	
Anticuerpo CD41 purificado	Abcam
Anticuerpo Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Life Technologies
Kit de marcaje de proteínas Alexa <sup>®</sup> 488	
Anticuerpo CD62P conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo CD41 conjugado con PE	Beckman Coulter
ABC	Sequoia Research Products
CBV-TP	

## 3. Comité ético

El Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia aprobó el proyecto dentro del cual se enmarca este estudio con muestras de cordón umbilical humano y sangre humana. Todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado y no se observaron diferencias significativas en cuanto al sexo, raza o etnia entre los diferentes grupos.

## 4. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.). Se realizaron un número de experimentos  $\geq 4$ . Los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza One-Way ANOVA, con la posterior corrección de Newman-Keuls, considerándose que la diferencia entre grupos es significativa cuando  $p < 0,05$ .

En algunos casos, los resultados se expresaron como porcentaje del control (%) considerando el control negativo (vehículo) como el 100%.

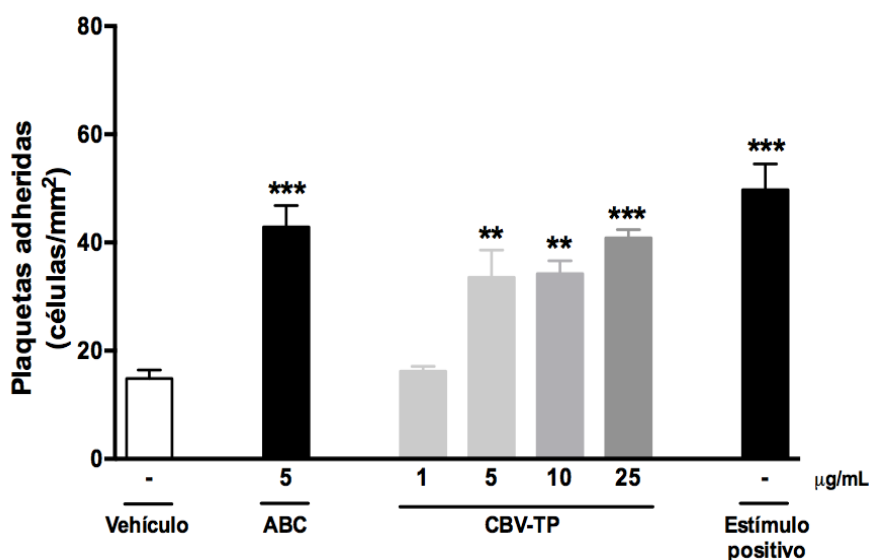
## IV. RESULTADOS

### 1. Estudio del efecto de CBV-TP sobre la interacción plaqueta- endotelio

#### 1.1 Interacción plaqueta-endotelio

Se analizó el efecto de CBV-TP sobre la interacción plaqueta-endotelio, como uno de los pasos implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, empleando la técnica de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo. Para ello, se incubaron las células endoteliales (HUVEC, 4h) y las plaquetas por separado con ABC y con concentraciones crecientes de CBV-TP (1-25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

ABC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) produjo un aumento significativo del número de plaquetas adheridas al endotelio. Este efecto fue reproducido por el metabolito activo CBV-TP a concentraciones de 5, 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (Fig. 14).

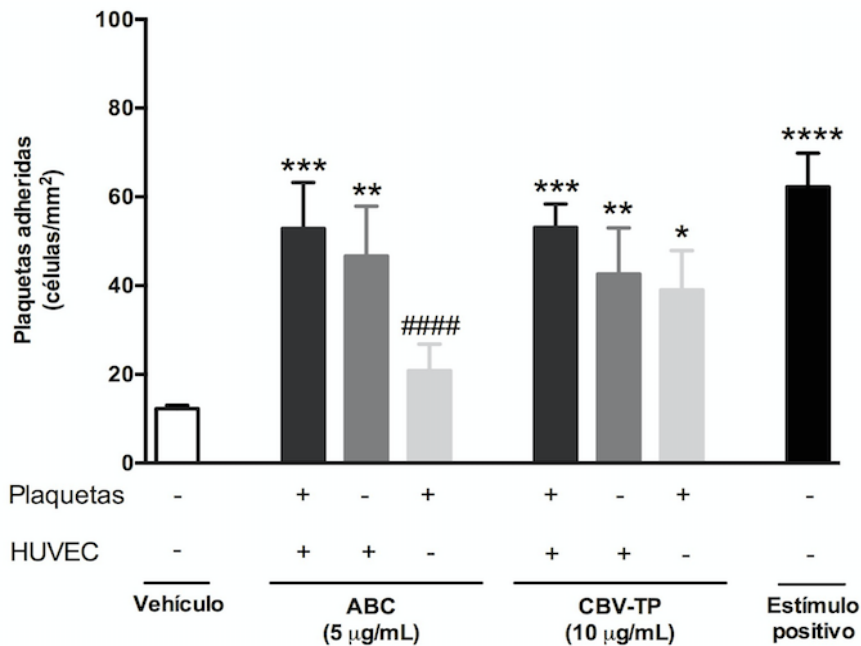


**Figura 14. Efecto de abacavir y de carbovir-trifosfato sobre la adhesión de plaquetas sobre células endoteliales.** Plaquetas y HUVEC fueron tratados independientemente (1 y 4 horas, respectivamente) con vehículo, abacavir (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), carbovir-trifosfato (1 - 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), o el control positivo [ADP (5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) para las plaquetas y TNF- $\alpha$  (25  $\text{ng}/\text{mL}$ ) para las HUVEC]. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por  $\text{mm}^2$ . Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 8). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto del valor correspondiente al grupo tratado con vehículo. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

## 1.2 Determinación del tipo celular implicado en la interacción plaqueta-endotelio inducida por CBV-TP

Tras determinar que de forma similar a como lo hace ABC, CBV-TP también induce la adhesión de plaquetas al endotelio, el siguiente paso fue determinar el tipo celular implicado en esta adhesión. Para ello se trataron sólo las plaquetas o sólo las células endoteliales con el fármaco o con su metabolito.

ABC y CBV-TP aumentaron significativamente el número de plaquetas adheridas a células endoteliales cuando ambos tipos celulares fueron tratados. En el caso de ABC, este efecto fue reproducido cuando se trataron únicamente las células endoteliales pero no cuando sólo se trataron las plaquetas. En el caso de CBV-TP, este efecto fue reproducido cuando se trataron únicamente las células endoteliales o cuando se trataron únicamente las plaquetas (Fig. 15).



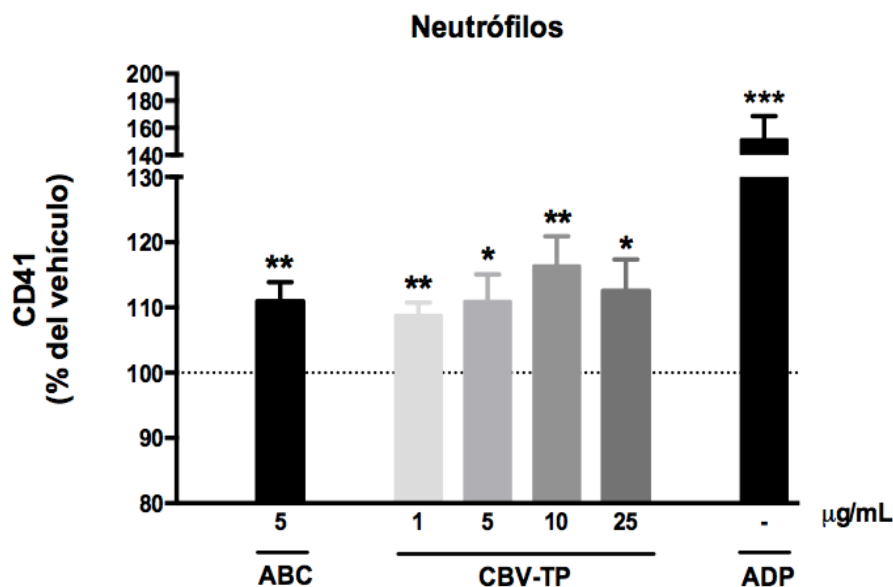
**Figura 15. Determinación del tipo celular implicado en la adhesión de plaquetas al endotelio inducida por abacavir o carbovir-trifosfato.** Las dos poblaciones celulares [HUVEC (4h) y plaquetas (1h)] o solo las células endoteliales o las plaquetas fueron tratadas individualmente con abacavir (5 µg/mL), carbovir-trifosfato (10 µg/mL), vehículo o el control positivo [ADP (5 µmol/L) para las plaquetas y TNF-α (25 ng/mL) para las HUVEC]. La figura muestra el número de plaquetas adheridas por mm<sup>2</sup>. Los resultados fueron expresados como media ± E.E.M. (n = 6). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001 respecto del valor correspondiente al grupo tratado con el vehículo y #####p<0,0001 respecto al tratamiento de los dos tipos celulares con abacavir. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

## 2. Análisis del efecto de CBV-TP sobre la interacción plaqueta-leucocito

Se evaluó el efecto de CBV-TP sobre la interacción plaqueta-leucocito, como uno de los pasos implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Se empleó la citometría de flujo para evaluar la adhesión de plaquetas a leucocitos en sangre entera de donantes sanos y se identificaron las diferentes subpoblaciones de leucocitos (neutrófilo, monocitos y linfocitos) gracias a sus características diferenciales en tamaño y granulosidad. La presencia de plaquetas en cada subpoblación celular se determinó analizando la expresión de CD41 (marcador específico de plaquetas) en cada una de ellas.

### 2.1 Interacción plaqueta-neutrófilo

ABC (5  $\mu\text{g/mL}$ ) produjo un aumento significativo en la cantidad de plaquetas adheridas a neutrófilos. Del mismo modo se observó esta respuesta con concentraciones crecientes de CBV-TP (1 - 25  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 16).

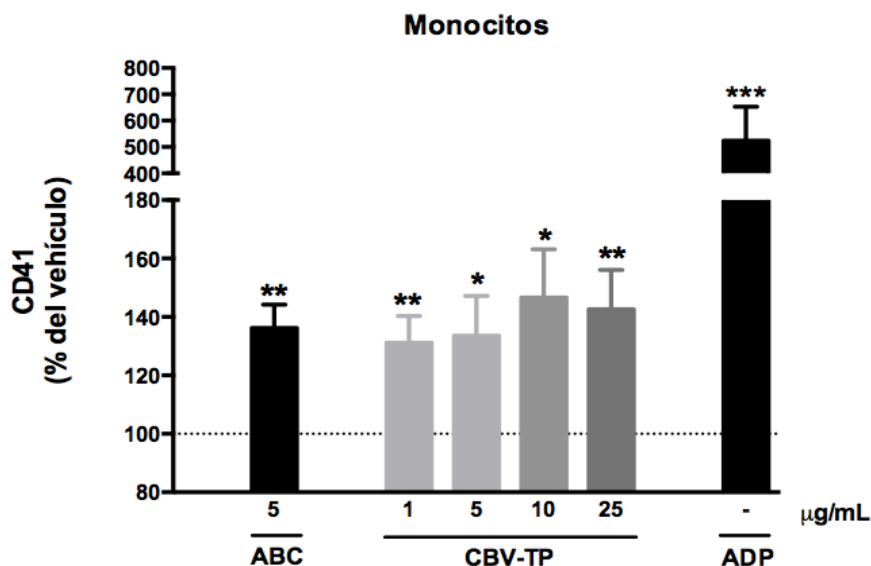


**Figura 16.** Efecto de abacavir y carbovir trifosfato sobre la adhesión de plaquetas sobre neutrófilos. La sangre humana fue tratada con vehículo, abacavir (5  $\mu\text{g/mL}$ ), carbovir-trifosfato (1 - 25  $\mu\text{g/mL}$ ) o el control positivo (ADP 5  $\mu\text{mol/L}$ ) (1 h). Los valores de fluorescencia (PE) representan el % de la mediana de la intensidad de la fluorescencia respecto del 100% del grupo control (vehículo). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 10). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto del valor correspondiente al grupo control. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.



## 2.2 Interacción plaqueta-monocito

ABC (5  $\mu\text{g/mL}$ ) produjo un incremento significativo del número de plaquetas adheridas a monocitos. Esta respuesta también se observó con concentraciones crecientes de CBV-TP (1 - 25  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 17).



**Figura 17.** Efecto de abacavir y carbovir trifosfato sobre la adhesión de plaquetas sobre monocitos. La sangre humana fue tratada con vehículo, abacavir (5  $\mu\text{g/mL}$ ), carbovir-trifosfato (1 - 25  $\mu\text{g/mL}$ ) o el control positivo (ADP 5  $\mu\text{mol/L}$ ) (1 h). Los valores de fluorescencia (PE) representan el % de la mediana de la intensidad de la fluorescencia respecto del 100% del grupo control (vehículo). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 10). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto del valor correspondiente al grupo control. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

## 2.3 Interacción plaqueta-linfocito

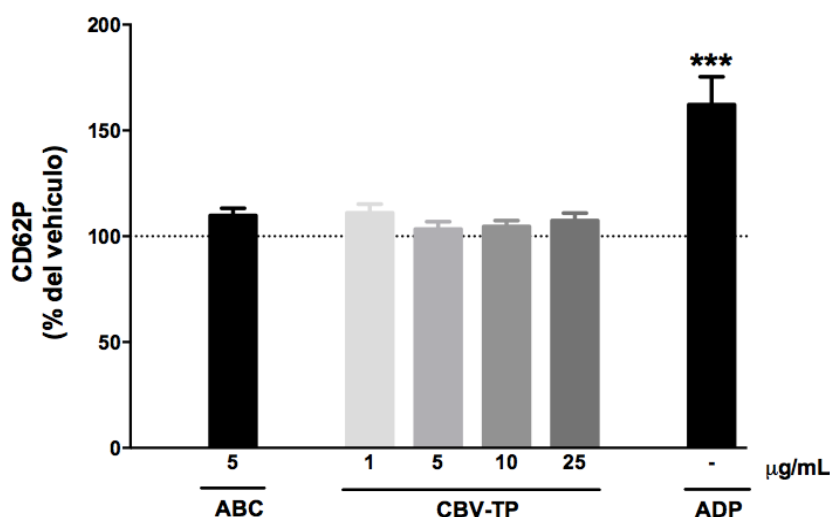
Tanto el tratamiento con ABC (5  $\mu\text{g/mL}$ ) como el tratamiento con CBV-TP (1 - 25  $\mu\text{g/mL}$ ) no estimularon la adhesión de plaquetas a linfocitos, ya que no se observaron incrementos significativos respecto al control (datos no mostrados).

### 3. Determinación del efecto de CBV-TP sobre la activación plaquetaria

El efecto de CBV-TP sobre la activación plaquetaria se evaluó analizando la expresión de la molécula de adhesión P-selectina en PRP extraído de sangre de donantes sanos. Mediante la citometría de flujo se identificó la población de plaquetas gracias a sus características de tamaño y granulosidad y empleando el anticuerpo CD62P se analizó la expresión de P-selectina.

#### 3.1 Análisis de la expresión de P-selectina en PRP

Se puede observar que el tratamiento de PRP con ABC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o con CBV-TP (1 - 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no indujo la expresión de P-selectina (CD62P) en plaquetas (Fig. 18), es decir, no se observaron aumentos significativos respecto al control.



**Figura 18.** Efecto de abacavir y carbovir-trifosfato sobre la expresión de CD62P (P-selectina) en plaquetas de PRP. El PRP fue tratado con vehículo, abacavir (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), carbovir-trifosfato (1 - 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o el control positivo (ADP 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) (1 h). Los valores de fluorescencia (FITC) representan el % de la mediana de la intensidad de la fluorescencia respecto del 100% del grupo control (vehículo). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  E.E.M. (n = 10). \*\*\* $p < 0,001$  respecto del valor correspondiente al grupo control. Análisis de varianza ANOVA seguido del post-test Newman-Keuls.

## V. DISCUSIÓN

La terapia antirretroviral se desarrolló en 1980 y permitió que la esperanza de vida de las personas infectadas con VIH y con SIDA incrementara considerablemente. Sin embargo, actualmente esta cobrando especial importancia el estudio de los efectos adversos asociados al uso de esta terapia. Los diferentes tipos de fármacos antirretrovirales se han asociado con diversos efectos adversos. Entre los efectos que se pueden desarrollar a corto plazo aparecen alteraciones cutáneas, hipersensibilidad, trastornos gastrointestinales y neuropsiquiátricos (Reust, 2011). A largo plazo, los pacientes pueden sufrir alteraciones metabólicas, anomalías en la distribución de la grasa corporal y lipodistrofia, daño mitocondrial, nefrotoxicidad e insuficiencia renal, osteopenia, osteoporosis, necrosis ósea (Montessori *et al.*, 2004; Reust, 2011) y también infarto de miocardio (Friis-Moller *et al.*, 2003; Sabin *et al.*, 2016; Sabin *et al.*, 2008).

Entre las causas de mortalidad en pacientes infectados con VIH no asociados a SIDA se encuentra el cáncer (23,5%), las enfermedades cardiovasculares (15,7%) y las enfermedades hepáticas (14,1%) (Maartens *et al.*, 2014). Las enfermedades cardiovasculares se han asociado al uso prolongado de la terapia antirretroviral. Sin embargo, no se conoce si esto se debe al aumento de la esperanza de vida de los pacientes, a la infección del VIH, por si misma, ya que se han aportado diversos argumentos que indican que el VIH incrementa el riesgo cardiovascular (Aberg, 2009; Triant, 2012) o a posibles efectos adversos de esta terapia antirretroviral (Friis-Moller *et al.*, 2003). Diversos estudios han asociado la terapia antirretroviral con la enfermedad cardiovascular. Inicialmente se apuntaba a los IP ya que aumentan los niveles de lípidos, pero el resto de grupos no se descartaron ya que se administran en combinación.

ABC es uno de los fármacos más empleados en la terapia antirretroviral. Existen evidencias crecientes que correlacionan el uso de los ITIAN análogos de purina, y más concretamente ABC y dDI, con la aparición de efectos cardiovasculares (Friis-Moller *et al.*, 2003; Sabin *et al.*, 2016). Sin embargo, ha habido mucha controversia con respecto a la asociación o no de ABC con enfermedades cardiovasculares, debido entre otras cosas a que a día de hoy no hay ninguna evidencia clara sobre cual podría ser el mecanismo por el que produce esta toxicidad cardiovascular.

Algunos estudios clínicos indican que el mecanismo podría deberse a un proceso de inflamación vascular (Sabin *et al.*, 2008). En nuestro laboratorio hemos analizado el efecto de ABC sobre la interacción leucocito-endotelio, primer paso en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que cursan con componente inflamatorio. Así, ABC indujo un aumento significativo en las interacciones leucocito-endotelio tanto *in vitro* como *in vivo* (De Pablo *et al.*, 2013).

Sin embargo, la plaqueta es necesaria para que este proceso inflamatorio desemboque en la formación de un trombo. Las plaquetas se activan y en consecuencia pueden formar agregados plaquetarios y trombos que pueden llevar a ocluir la arteria coronaria resultando en isquemia e infarto de miocardio (Davì & Patrono, 2007; Hansson, 2005). En este sentido, en estudios previos se ha observado que el tratamiento con ABC

induce la interacción plaqueta-endotelio, interacción plaqueta-neutrófilo e interacción plaqueta-monocito, sin causar activación plaquetaria (aumento de P-selectina). El mecanismo por el cual ABC posee estos efectos no se conoce. Una posibilidad sería que el responsable fuera CBV-TP ya que tiene gran analogía estructural con ATP y ADP.

ABC se metaboliza en el organismo para dar lugar a su metabolito farmacológicamente activo, CBV-TP que interfiere en el ciclo del virus actuando como sustrato en la síntesis del ADN viral mediante la transcriptasa inversa de forma que provoca la terminación de la síntesis de la hebra de ADN (Barbarino *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 1991).

Por tanto, el objetivo de este trabajo consiste en caracterizar los efectos y los mecanismos pro-inflamatorios de CBV-TP sobre la función plaquetaria. Es decir, estudiar el efecto de este fármaco en la interacción plaqueta-endotelio, en la interacción plaqueta-leucocito y sobre la expresión de P-selectina, empleada como marcador de la activación plaquetaria.

En pacientes adultos la pauta posológica de ABC es de 300 mg/12h o 600 mg/24h, originándose una concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>) de 4,85 µg/mL. Teniendo en cuenta las concentraciones plasmáticas de ABC anteriormente citadas obtenidas en pacientes seleccionamos la concentración de ABC 5 µg/mL y concentraciones de CBV-TP entre 1 - 25 µg/mL, valores que mimetizan las concentraciones de ABC y CBV-TP alcanzadas en pacientes que reciben este tratamiento (Yuen *et al.*, 2008).

En primer lugar, para evaluar la interacción plaqueta-endotelio hemos empleado un modelo *in vitro* de adhesión dinámica, mediante un sistema de cámara paralela de flujo en el que las plaquetas fluyen sobre la monocapa endotelial con un flujo similar al observado *in vivo*. Así, concentraciones clínicas de CBV-TP (5 - 25 µg/mL) inducen adhesión de plaquetas al endotelio, mientras que CBV-TP 1 µg/mL no induce esta adhesión. Tanto ABC como CBV-TP son capaces de inducir la adhesión de plaquetas al endotelio y con ello podrían promover el inicio de la formación del trombo.

Una vez establecido que CBV-TP induce interacción plaqueta-endotelio se determinó el tipo celular implicado en la adhesión de plaquetas al endotelio inducida por ABC y CBV-TP. En el caso de ABC, únicamente hay efecto cuando se tratan los dos tipos celulares o cuando se tratan sólo las células endoteliales. En el caso de CBV-TP, el efecto se observó en todos los casos, cuando se trataron los dos tipos celulares, sólo las plaquetas o sólo las células endoteliales.

Por otro lado, se ha evaluado la interacción plaqueta-leucocito, mediante citometría de flujo, de forma que empleando un anticuerpo que reconoce específicamente plaquetas (CD41) se ha analizado su expresión en las poblaciones de leucocitos, concretamente en neutrófilos, monocitos y linfocitos. Se ha observado que concentraciones clínicamente relevantes de CBV-TP estimulan la adhesión de plaquetas tanto a neutrófilos como a monocitos tal y como se había observado con el efecto de ABC en los estudios realizados previamente.

También se ha evaluado la expresión de moléculas de adhesión empleando la técnica de citometría de flujo. La molécula de adhesión analizada fue P-selectina (CD62P) implicada en la interacción plaqueta-endotelio, plaqueta-leucocito e indicadora de la activación plaquetaria. Sin embargo, tal y como se había observado previamente en el tratamiento de PRP con ABC, CBV-TP tampoco induce ningún aumento en la expresión de este marcador, y por tanto podemos afirmar que CBV-TP no estimula la activación plaquetaria.

En conclusión, se ha observado que CBV-TP estimula la adhesión de plaquetas al endotelio, también la interacción plaqueta-leucocito, en concreto la adhesión de plaquetas a neutrófilos y monocitos, pero no tiene efecto sobre el aumento de la expresión de P-selectina y por tanto, sobre la activación plaquetaria. Al comparar los efectos de los dos compuestos sobre la función plaquetaria observamos que ambos tienen efectos similares. Sin embargo, sí que se ha observado una diferencia entre los efectos de estos dos compuestos. Esta diferencia indica que ABC está ejerciendo un efecto únicamente sobre células endoteliales mientras que CBV-TP ejerce su acción tanto sobre células endoteliales como sobre plaquetas. No obstante, esto no es suficiente para poder afirmar que los efectos observados asociados a ABC estén debidos a su metabolito activo, CBV-TP y harían falta experimentos adicionales que permitieran alcanzar una conclusión de forma directa administrando ABC e inhibiendo su transformación a CBV-TP.

Dada la importancia de estos fármacos en la terapia antirretroviral actual, la controversia generada en torno a ellos y teniendo en cuenta la limitación que supone haber utilizado células de pacientes sin VIH, las diferencias observadas en el perfil de toxicidad cardiovascular apoyan la asociación clínica tanto entre ABC y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como entre CBV-TP y la enfermedad cardiovascular.

## VI. CONCLUSIONES

Concentraciones clínicamente relevantes de CBV-TP:

1. Inducen interacción plaqueta-endotelio *in vitro*. La estimulación selectiva de plaquetas o de células endoteliales por parte de CBV-TP es suficiente para que se de esta interacción.
2. Inducen interacción plaqueta-leucocito *in vitro*, específicamente plaqueta-neutrófilo y plaqueta-monocito, no produciendo interacción plaqueta-linfocito.
3. No inducen un aumento de la expresión de P-selectina, es decir, no causan activación plaquetaria *in vitro*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ABERG, J. A. (2009). Cardiovascular complications in HIV management: Past, present, and future. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 50(1): 54–64.
- ÁLVAREZ, Á., HERMENEGILDO, C., ISSEKUTZ, A. C., ESPLUGUES, J. V. & SANZ, M. J. (2002). Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circulation Research*, 91(12): 1142–1150.
- ÁLVAREZ, Á. & SANZ, M. J. (2001). Reactive oxygen species mediate angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(2): 199–206.
- ANDERSON, B. D. & CHIANG, C. Y. (1990). Physicochemical properties of carbovir, a potential anti-HIV agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79(9): 787–90.
- BAILEY, A. C. & FISHER, M. (2008). Current use of antiviral treatment. *British Medical Bulletin*, 87(1): 175–192.
- BARBARINO, J. M., KROETZ, D. L., ALTMAN, R. B. & KLEIN, T. E. (2014). PharmGKB summary: abacavir pathway. *Wolters Kluwer Health*, 24(5): 276–282.
- BARTLETT, J. A., FATH, M. J., DEMASI, R., HERMES, A., QUINN, J., MONDOU, E. & ROUSSEAU, F. (2006). An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-infected adults. *AIDS*, 20(16): 2051–2064.
- BEDIMO, R. J., WESTFALL, A. O., DRECHSLER, H., VIDIELLA, G. & TEBAS, P. (2011). Abacavir use and risk of acute myocardial infarction and cerebrovascular events in the highly active antiretroviral therapy era. *Clinical Infectious Diseases*, 53(1): 84–91.
- BRODER, S. (2010). The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Research*, 85(1): 1–18.
- BROTHERS, C. H., HERNANDEZ, J. E., CUTRELL, A. G., CURTIS, L., AIT-KHALED, M., BOWLIN, S. J. & LAPIERRE, D. H. (2009). Risk of myocardial infarction and abacavir therapy: no increased risk across 52 GlaxoSmithKline-sponsored clinical trials in adult subjects. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 51(1): 20–8.
- CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P. D. & SODROSKI, J. (1996). The B-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 85(7): 1135–1148.
- CHOI, A. I., VITTINGHOFF, E., DEEKS, S. G., WEEKLEY, C. C., LI, Y. & SHLIPAK, M. G. (2011). Cardiovascular risks associated with abacavir and tenofovir exposure in HIV-infected persons. *AIDS*, 25(10): 1289–1298.

- CRUCIANI, M., ZANICHELLI, V., SERPELLONI, G., BOSCO, O., MALENA, M., MAZZI, R. & MOYLE, G. J. (2011). Abacavir use and cardiovascular disease events: a meta-analysis of published and unpublished data. *Aids*, 25(16): 1993–2004.
- CUTRELL, A., BROTHERS, C., YEO, J., HERNANDEZ, J. & LAPIERRE, D. (2008). Abacavir and the potential risk of myocardial infarction. *Lancet*, 371(9622): 1413.
- DALUGE, S. M., GOOD, S. S., FALETTA, M. B., MILLER, W. H., CLAIR, M. H. ST., BOONE, L. R. & KRENITSKY, T. A. (1997). 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5):1082–1093.
- DAVÌ, G. & PATRONO, C. (2007). Platelet activation and atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine*, 357(24): 2482–2494.
- DE PABLO, C., ORDEN, S., APOSTOLOVA, N., BLANQUER, A., ESPLUGUES, J. V. & ÁLVAREZ, Á. (2010). Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS*, 24(9): 1259-1266.
- DE PABLO, C., ORDEN, S., CALATAYUD, S., MARTÍ-CABRERA, M., ESPLUGUES, J. V. & ÁLVAREZ, Á. (2012). Differential effects of tenofovir/emtricitabine and abacavir/lamivudine on human leukocyte recruitment. *Antiviral Therapy*, 17(8): 1615–1619.
- DE PABLO, C., ORDEN, S., PERIS, J. E., BARRACHINA, M. D., ESPLUGUES, J. V. & ÁLVAREZ, Á. (2013). Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in vivo. *Journal of Infectious Diseases*, 208(9): 1448–1453.
- DIACOVO, T. G., ROTH, S. J., BUCCOLA, J. M., BAINTON, D. F. & SPRINGER, T. A. (1996). Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*, 88(1): 146–157.
- ESPLUGUES, J. V., DE PABLO, C., COLLADO-DÍAZ, V., HERNÁNDEZ, C., ORDEN, S. & ÁLVAREZ, Á. (2016). Interference with purinergic signalling: an explanation for the cardiovascular effect of abacavir?. *AIDS*. 30(9): 1341-51.
- FALETTA, M. B., MILLER, W. H., GARVEY, E. P., CLAIR, M. H. ST., DALUGE, S. M. & GOOD, S. S. (1997). Unique intracellular activation of the potent anti-human immunodeficiency virus agent 1592U89. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5): 1099–1107.
- FENG, Y., BRODER, C. C., KENNEDY, P. E. & BERGER, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272: 872–877.



- FREED, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(8): 484–496.
- FRENETTE, P. S., DENIS, C. V., WEISS, L., JURK, K., SUBBARAO, S., KEHREL, B. & WAGNER, D. D. (2000). P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 191(8): 1413–1422.
- FRIIS-MOLLER, N., SABIN, C. A., WEBER, R., D'ARMINIO MONFORTE, A., EL-SADR, W. M., REISS, P. & LUNDGREN, J. D. (2003). Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 349(21): 1993–2003.
- GARDINER, E. E., DE LUCA, M., MCNALLY, T., MICHELSON, A. D., ANDREWS, R. K. & BERNDT, M. C. (2001). Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G. *Blood*, 98(5): 1440–1447.
- GAWAZ, M. (2004). Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research*, 61(3): 498–511.
- GAWAZ, M., NEUMANN, F. J., DICKFELD, T., KOCH, W., LAUGWITZ, K. L., ADELSBERGER, H. & BRAND, K. (1998). Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*, 98(12): 1164–1171.
- GRILO, N. M., ANTUNES, A. M. M., CAIXAS, U., MARINHO, A. T., CHARNEIRA, C., CONCEIÇÃO OLIVEIRA, M. & PEREIRA, S. A. (2013). Monitoring abacavir bioactivation in humans: Screening for an aldehyde metabolite. *Toxicology Letters*, 219(1): 59–64.
- GRINSPOON, S., GRUNFELD, C., KOTLER, D., CURRIER, J., LUNDGREN, J., DUBE, M. & LEHMANN, R. (2008). Executive summary state of the science conference: Initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living HIV/AIDS. *Circulation*, 118(2): 198–210.
- GÜNTHARD, H. F., ABERG, J. A., ERON, J. J., HOY, J. F., TELENTI, A., BENSON, C. A. & VOLBERDING, P. A. (2014). Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. *Jama*, 308(4): 387–402.
- HANSSON, G. K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 352(16): 1685–1695.
- HEINDL, B., ZAHLER, S., WELSCH, U. & BECKER, B. F. (1998). Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischemic hearts. *Cardiovascular Research*, 38(2): 383–394.

- HENN, V., SLUPSKY, J. R., GRÄFE, M., ANAGNOSTOPOULOS, I., FÖRSTER, R., MÜLLER-BERGHAUS, G. & KROCZEK, R. A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, *391*: 591–594.
- HOOSHYAR, D., HANSON, D. L., WOLFE, M., SELIK, R. M., BUSKIN, S. E. & MCNAGHTEN, A. D. (2007). Trends in perimortal conditions and mortality rates among HIV-infected patients. *AIDS*, *21*(15): 2093–2100.
- IBIZA, S., ALVAREZ, A., ROMERO, W., BARRACHINA, M. D., ESPLUGUES, J. V. & CALATAYUD, S. (2009). Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *297*(6): C1588–1595.
- JENS D. LUNDGREN, NEUHAUS, J., BABIKER, A., COOPER, D., DUPREZ, D., EL-SADR, W. & NEATON, J. D. (2008). Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients. *AIDS*, *22*(14): F17–F24.
- JOHNSON, R. C., MAYADAS, T. N., FRENETTE, P. S., MEBIUS, R. E., SUBRAMANIAM, M., LACASCE, A. & WAGNER, D. D. (1995). Blood cell dynamics in P-Selectin-deficient mice. *Blood*, *86*(3): 1106–1114.
- KAHNER, B. N., SHANKAR, H., MURUGAPPAN, S., PRASAD, G. L. & KUNAPULI, S. P. (2006). Nucleotide receptor signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *4*(11): 2317–2326.
- KAKUDA, T. N. (2000). Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clinical Therapeutics*, *22*(6): 685–708.
- KLINGER, M. H. F. & JELKMANN, W. (2002). Role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *22*(9): 913–922.
- LAGADEC, P., DEJOUX, O., TICCHIONI, M., COTTREZ, F., JOHANSEN, M., BROWN, E. J. & BERNARD, A. (2003). Involvement of a CD47-dependent pathway in platelet adhesion on inflamed vascular endothelium under flow. *Blood*, *101*(12): 4836–4843.
- LASKEY, S. B. & SILICIANO, R. F. (2014). A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(11): 772–780.
- LEUNG, G. P. & TSE, C. (2007). The role of mitochondrial and plasma membrane nucleoside transporters in drug toxicity. *Drug Metabolism Toxicology*, *3*(5): 705–718.
- MAARTENS, G., CELUM, C. & LEWIN, S. R. (2014). HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, *384*: 258–271.

- MAHONY, W. B., DOMIN, B. A., DALUGE, S. M. & ZIMMERMAN, T. P. (2004). Membrane permeation characteristics of abacavir in human erythrocytes and human T-lymphoblastoid CD4 + CEM cells: Comparison with (-)-carbovir. *Biochemical Pharmacology*, 68(9): 1797–1805.
- MCDOWELL, J. A., CHITTICK, G. E., RAVITCH, J. R., POLK, R. E., KERKERING, T. M. & STEIN, D. S. (1999). Pharmacokinetics of [(14)C]abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12): 2855–2861.
- MONTESSORI, V., PRESS, N., HARRIS, M., AKAGI, L. & MONTANER, J. S. (2004). Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *Journal of Canadian Medical Association*, 170(2): 229–238.
- NIIYA, K., HODSON, E., BADER, R., BYERS-WARD, V., KOZIOL, J. A., PLOW, E. F. & RUGGE, Z. M. (1987). Increased surface Expression of the Membrane Glycoprotein IIb/IIIa Complex Induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation, 70(2): 475–483.
- ORDEN, S., DE PABLO, C., RIOS-NAVARRO, C., MARTINEZ-CUESTA, M. A., PERIS, J. E., BARRACHINA, M. D. & ALVAREZ, A. (2013). Efavirenz induces interactions between leucocytes and endothelium through the activation of Mac-1 and gp150,95. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4): 995–1004.
- PANEL DE EXPERTOS DE GESIDA Y PLAN NACIONAL SOBRE EL SIDA. (2015). Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2015), 101.
- PARKER, W. B., WHITE, E. L., SHADDIX, S. C., ROSS, L. J., BUCKHEIT JR., R. W., GERMANY, J. M. & SHANNON, W. M. (1991). Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human DNA polymerases alpha, beta, and gamma by the 5'-triphosphates of carbovir, 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxyguanosine and 3'-deoxythymidine. A novel RN. *Journal of Biological Chemistry*, 266(3): 1754–1762.
- PILIERO, P. J. (2004). Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 37 (1): S2–S12.
- RADOMSKI, M. & MONCADA, S. (1983). An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. *Thrombosis Research*, 30(4): 383–389.
- RENDU, F. & BROHARD-BOHN, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5): 261–273.

- REUST, C. E. (2011). Common adverse effects of antiretroviral therapy for HIV disease. *American Family Physician*, 83(12): 1443–1451.
- RIBAUDO, H. J., BENSON, C. A., ZHENG, Y., KOLETAR, S. L., COLLIER, A. C., LOK, J. J. & SCHOUTEN, J. T. (2011). No risk of myocardial infarction associated with initial antiretroviral treatment containing abacavir: Short and long-term results from ACTG A5001/ALLRT. *Clinical Infectious Diseases*, 52(7): 929–940.
- RIBERA, E., TUSET, M., MARTÍN, M. & DEL CACHO, E. (2011). Características de los fármacos antirretrovirales. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(5): 362–391.
- SABIN, C. A., REISS, P., RYOM, L., PHILLIPS, A. N., WEBER, R., LAW, M. & LUNDGREN, J. D. (2016). Is there continued evidence for an association between abacavir usage and myocardial infarction risk in individuals with HIV? A cohort collaboration. *BMC Medicine*, 14(61).
- SABIN, C., WORM, S., WEBER, R. & REISS, P. (2008). Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet*, 371(9622): 1417–1426.
- SPRINGER, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76: 301–314.
- THE ANTIRETROVIRAL THERAPY COHORT COLLABORATION. (2008). Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*, 372(9635): 293–299.
- TRIAINT, V. A. (2012). HIV infection and coronary heart disease: An intersection of epidemics. *Journal of Infectious Diseases*, 205(3): 355–361.
- VARGA-SZABO, D., BRAUN, A. & NIESWANDT, B. (2009). Calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(7): 1057–1066.
- VARGA-SZABO, D., PLEINES, I. & NIESWANDT, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(3): 403–413.
- VINCE, R., HUA, M., BROWNELL, J., DALUGE, S., LEE, F., SHANNON, W. M. & BOYD, M. R. (1988). Potent and selective activity of a new carbocyclic nucleoside analog (Carbovir: NSC 614846) against human immunodeficiency virus In vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 156(2): 1046–1053.
- WAGNER, D. D. & FRENETTE, P. S. (2008). The vessel wall and its interactions. *Blood*, 111(11): 5271–5281.

- WANG, X., CHAI, H., LIN, P. H., YAO, Q. & CHEN, C. (2009). Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *The American Journal of Pathology*, 174(3): 771–781.
- WEYRICH, S. A., ELSTAD, R. M., MCEVER, P. R., MCINTYRE, M. T., MOORE, L. M., MORRISEY, H. J. & ZIMMERMAN, A. G. (1996). Activated platelet signal chemokine synthesis by human monocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 97(6): 1525–1534.
- WHITE, E. L., PARKER, W. B., MACY, L. J., SHADDIX, S. C., MCCALEB, G., SECRIST III, J. A. & SHANNON, W. M. (1989). Comparison of the effect of carbovir, AZT, and dideoxynucleoside triphosphates on the activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and selected human polymerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2): 393–398.
- YUEN, G. J., WELLER, S. & PAKES, G. E. (2008). A review of the pharmacokinetics of abacavir. *Clinical Pharmacokinetics*, 47(6): 351–371.